

**L'EFFET DU PHÉNOBARBITAL
SUR L'ACTIVITÉ CHOLINESTÉRASIQUE
DU SANG ET DE L'ENCÉPHALE, AINSI QUE
SUR LE MÉCANISME CHOLINERGIQUE**

THÈSE

**PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

PAR

AHARON SHOHE

DE

RAMAT-GAN (ISRAËL)

THÈSE N° 1223

AMBILLY

COOPÉRATIVE « LES PRESSES DE SAVOIE »

1954

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

INSTITUT DE THÉRAPEUTIQUE

FACULTÉ DES SCIENCES

DIRECTEUR : PROF. ED. FROMMEL

L'EFFET DU PHÉNOBARBITAL
SUR L'ACTIVITÉ CHOLINESTÉRASIQUE
DU SANG ET DE L'ENCÉPHALE, AINSI QUE
SUR LE MÉCANISME CHOLINERGIQUE

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

AHARON SHOHE

DE

RAMAT-GAN (ISRAËL)

THÈSE N° 1223

AMBILLY

COOPÉRATIVE « LES PRESSES DE SAVOIE »

1954

La Faculté des Sciences, sur le préavis de Monsieur le Professeur E. Frommel, autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 11 mai 1954.

Le Doyen :
Paul-E. WENGER.



A mes parents.

A ma femme.

Nous remercions M. le Professeur Ed. Frommel, Directeur de l'Institut de Thérapeutique de Genève, qui nous a ouvert les portes de l'Institut et a mis à notre disposition les appareils nécessaires à notre expérimentation.

Nos remerciements vont également à M. le Docteur C. Radouco, Chef de travaux de l'Institut de Thérapeutique, directeur de notre thèse, qui a suivi nos travaux avec le plus grand intérêt.

Nous remercions enfin toute l'équipe de recherches du laboratoire de l'Institut de Thérapeutique, dont la collaboration à notre thèse a été très appréciée.

Que M. le Professeur A. Mirimanoff, Administrateur de l'Ecole de Pharmacie de l'Université de Genève, veuille bien trouver ici l'expression de notre sincère gratitude pour la grande bienveillance qu'il nous a témoignée pendant nos études à Genève.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546406_0077

TABLE DES MATIERES

	PAGES
CHAPITRE I. — Historique	9
CHAPITRE II. — Considérations générales sur les cholinestérases	11
CHAPITRES III. — Conditions expérimentales	16
1. Enzymes	16
(1) Cholinestérases du sang	16
A. Types	16
B. Préparation	17
(2) Cholinestérases du cerveau	17
A. Type et distribution	17
B. Préparation	18
2. Substrats	18
3. Solution-tampon (Krebs-Ringer)	19
4. Phénobarbital	19
CHAPITRE IV. — Méthodes	21
1. Méthodes de mesure de l'activité cholinestérasiques	21
(1) Méthode biologique	21
(2) Méthodes chimiques	21
A. Méthodes manométriques	21
B. Méthode titrimétrique	22
a) Méthode des indicateurs	23
b) Méthode électrométrique	23
C. Méthode électrométrique de Michel	25
D. Méthode colorimétrique	25
(3) Méthode histochimique	26
2. Méthodes de mesure de l'activité anticholinergique du Phénobarbital	26
3. Méthode de mesure de l'activité, de la toxicité et du métabolisme du Phénobarbital	26

	PAGES
CHAPITRE V. — Résultats expérimentaux	30
1. Résultats concernant le métabolisme, l'activité et la toxicité du Phb en expérimentation	30
A. Métabolisme	30
B. Activité et toxicité	30
2. Résultats concernant les valeurs physiologiques chez le cobaye de la ChE du plasma, des érythrocytes et du cerveau	33
A. Mesures préliminaires	33
B. Activité cholinestérasique chez l'animal normal .	35
a) Méthode manométrique d'Ammon	35
1) Les cholinestérases du sang	36
2) Les cholinestérases du système nerveux central	37
3. Résultats concernant l'action du Phb sur la ChE du plasma, des érythrocytes et du cerveau	37
A. Action du Phb <i>in vivo</i>	37
a) Doses uniques	38
b) Doses chroniques	39
B. Action du Phb <i>in vitro</i>	41
a) Méthode manométrique	41
b) Méthode électrotitrimétrique	41
4. Résultats concernant l'action du Phb sur l'effet cholinergique de l'acétylcholine	42
CHAPITRE VI. — Discussion et conclusion	44
Bibliographie	49

Dans notre texte, le terme Acétylcholine sera représenté par le symbole ACh, celui de Cholinestérase par ChE et celui de Phénobarbital par Phb.

CHAPITRE PREMIER

Historique

Parmi les très nombreuses publications sur la ChE, une faible partie seulement concerne ses relations avec les barbituriques. Nous allons tenter de résumer brièvement ces quelques travaux.

En 1936, Bernheim F. et Bernheim M.L.C.¹⁰ ont étudié l'influence des hypnotiques et de certains anesthésiques sur la ChE du cerveau. Ces substances n'ont été étudiées que *in vitro*, par la méthode biologique (organe isolé) et par titration. Les auteurs ont employé l'enzyme de différents animaux (chien, chat, lapin, cobaye et souris). Ils n'ont trouvé aucun effet sur l'activité enzymatique à des concentrations correspondant à la concentration présumée du barbiturique provoquant l'effet thérapeutique (0,001 M).

D'après Heim et Fahr,²⁷ l'étude de la pression artérielle chez le chat montre que des narcotiques (tel que le véronal sodique) à une faible concentration présentent un effet activateur, alors qu'à une concentration élevée, ils inhibent l'action de la ChE.

Genuit et Labenz²⁶, Heim et Rhode²⁸ ont orienté également leurs travaux sur l'influence qu'exerceraient les barbituriques sur la ChE. Les premiers ont usé, pour l'étude, du muscle cardiaque, et les derniers de la méthode d'Ammon. Leurs résultats confirment en une certaine mesure les résultats antérieurs. En ce qui concerne les barbituriques, cependant, les variations ne semblent pas significatives.

Adriani et Rovenstein¹ ont étudié par la méthode manométrique l'effet *in vitro* de l'Évipan sur l'activité de l'enzyme du sérum. Ils n'ont constaté aucun effet.

Schutz^{58, 59, 60, 61} a analysé l'effet des barbituriques sur le système cholinergique chez des sujets épileptiques. Ces recherches ont été effectuées sur l'enzyme du sérum par la méthode de Hall et Lucas.

Schutz a trouvé que les barbituriques n'exercent aucun effet sur la ChE du sérum *in vitro* et *in vivo*, après avoir administré de fortes doses en une fois chez le cobaye.

Par contre, chez les épileptiques, ainsi que chez les sujets normaux, l'administration de doses répétées a provoqué une diminution graduelle de l'activité cholinestérasique du sérum.

L'Institut de Thérapeutique de Genève s'est également intéressé à ce problème en son temps. C'est ainsi que Frommel, Bischler, Gold, Favre et Vallette,²³ dans leurs « Recherches dans le domaine du som-

meil », ont étudié l'effet de l'association de certains médicaments avec le Somnifène Roche sur l'activité de la ChE sérique chez le cobaye.

Les dosages effectués par la méthode de Hall et Lucas ont montré que le Somnifène exerce une inhibition de force moyenne sur l'activité enzymatique.

De même, Frommel, Favre et Vallette²⁴ ont pu constater dans une autre étude l'inhibition de la ChE sérique du cobaye, provoquée par l'acide diallylbarbiturique ou son sel sodique.

Lévy³⁴ a travaillé sur l'action des hypnotiques sur la ChE du sang du rat. Cet auteur observe une certaine inhibition fermentative par le Soneryl. Mais la concentration des drogues utilisée pour obtenir l'inhibition *in vitro* cependant n'a pas de rapport avec celle présumée donnant l'effet thérapeutique.

Nous constatons donc que les données du laboratoire sont contradictoires. C'est cette incertitude qui nous a poussé à en reprendre l'étude, avec une méthodologie rigoureuse et classique.

CHAPITRE II

Considérations générales sur les cholinestérases

L'ACh est une substance dont l'importance et le rôle physiologique ont été démontrés par les travaux de Lœwi³⁸ ainsi que par les nombreux auteurs qui ont suivi.

Lors de l'excitation d'un nerf, celui-ci émet à sa terminaison de l'ACh qui stimule les organes effecteurs (ou de la sympathine pour les fibres sympathiques post-ganglionnaires).

L'ACh accomplissant son rôle est aussitôt décomposée en choline et acide acétique, tous deux physiologiquement inactifs. Cette intervention est due à l'action d'un enzyme, la ChE. Le rôle de la ChE est donc de limiter l'influx nerveux transmis par l'ACh. Cette action permet d'avoir pour chaque stimulation une seule réponse et forme ainsi une barrière contre l'action prolongée de l'ACh.

Malgré la grande avance réalisée dans l'étude de ce mécanisme, la question reste encore assez obscure. L'une des autorités en la matière, David Nachmansohn, s'exprime ainsi à ce sujet : « ... Nous devons donc supposer que l'ACh est libérée d'une forme liée par un processus extrêmement rapide. Je présume que l'ACh est liée à une protéine ou une lipoprotéine, et que par le passage du courant (c'est-à-dire par un mouvement rapide d'ion), l'ester est libéré du complexe et agit sur une protéine réceptive.

L'action de l'ester sur la protéine réceptrice provoque un changement de cette dernière, une polymérisation ou une dépolymérisation, qui est la cause du changement de perméabilité.

Il y a équilibre entre l'ACh libre et l'ACh agissant sur la protéine. Dans sa forme libre, l'ester est attaqué par la ChE. Quand la majeure partie de l'ACh est hydrolysée, la protéine réceptrice retourne à sa forme première... »⁴⁶

De ce qui précède, il apparaît qu'une substance agissant sur la transmission nerveuse peut influencer sur un ou plusieurs facteurs différents qui, ensemble, forment le complexe du mécanisme biologique. Ce phénomène peut être dû à une action activatrice ou inhibitrice sur la cholinacétylase, sur la libération de l'ACh de sa forme liée, sur la ChE, ainsi que sur la protéine réceptrice.

Une question importante concernant l'étude de la ChE est celle de

la spécificité de l'enzyme. Nous avons jugé nécessaire de faire le point sur cette question avant d'aborder notre sujet.

Jusqu'en 1940, la ChE du sérum et du tissu nerveux était considérée comme une même estérase. Les travaux furent, jusqu'à cette époque, effectués indifféremment sur la ChE des tissus, sur celle des globules ou sur celle du sérum. C'est à partir de 1940 que l'on se rendit compte qu'il existait plusieurs types de ChE. Cette constatation permit de dissiper certaines contradictions apparentes provenant de travaux antérieurs. Cette distinction inaugura également une série de recherches qui tendent à prouver l'existence, la réalité de différentes estérases, enfin à trouver un moyen de les distinguer. Cette période de tâtonnements a vu naître des suppositions et suggestions diverses, dont quelques-unes se sont avérées fausses et dont d'autres, bien qu'exactes, n'ont pas apporté de solution complète à ce problème.

En 1932 déjà, Stedman⁶³ a fait remarquer que la liaison estérique de l'ACH n'a rien de remarquable et qu'elle peut être rompue (hydrolysée) par d'autres estérases qui existent en grand nombre dans l'organisme.

Alles et Hawes³ furent les premiers à prouver, en 1940, l'existence de différents enzymes. En étudiant l'activité de la ChE, ils démontrent que la ChE des érythrocytes est inhibée par une forte concentration d'ACH, alors que la ChE du sérum ne l'est pas. Alles et Hawes prouvent également que la ChE des érythrocytes est capable d'hydrolyser l'acétyl- β -méthylcholine, substrat qui n'est pas hydrolysé par l'estérase du sérum.

Ce sont Richter et Croft⁵³, Zeller et Bissegger⁷⁰ qui poursuivirent les recherches dans ce sens et confirmèrent les constatations précédentes : la ChE du cerveau et celle des érythrocytes semblent avoir les mêmes propriétés et sont spécifiques à l'ACH.

Mendel et Rudney,⁴² dans une série de travaux, ont montré que la plupart des préparations brutes de cholinestérases sont capables d'hydrolyser des esters ordinaires. Une légère purification des cholinestérases provenant des érythrocytes de diverses espèces les prive de leur pouvoir d'hydrolyse des esters ordinaires, tributyrine et méthylbutyrate, alors qu'une purification plus poussée du sérum de cheval ou de pancréas de chien augmente le pouvoir hydrolysant de ces préparations, mais ne change pas le rapport de l'activité de l'enzyme vis-à-vis de l'ACH et de la tributyrine.

Mendel et Mundell⁴¹ ont aussi prouvé que la benzoylcholine est hydrolysée par l'estérase du sérum et non par celle des érythrocytes et du cerveau, alors que l'acétyl- β -méthylcholine est hydrolysée par l'estérase des érythrocytes et du cerveau, et non par celle du sérum.

Augustinsson,⁵ au contraire, a trouvé que la benzoylcholine est hydrolysée par l'enzyme du cerveau. Cette hydrolyse est moins forte que celle de l'acétyl- β -méthylcholine, mais elle n'est pas négligeable. Par exemple, pour le cerveau de chien, le rapport de dégagement du CO₂ à partir de l'acétyl- β -méthylcholine et de la benzoylcholine est de 27/15.

Comme Mendel et Mundell, Augustinsson a trouvé que l'acétyl- β -méthylcholine est hydrolysée par l'enzyme du plasma, moins fortement que la benzoylcholine. Le rapport du dégagement de CO_2 à partir de benzoylcholine et d'acétyl- β -méthylcholine est de 40/11.

Augustinsson a constaté que l'hydrolyse de l'ACh, du Mecholyl, de la benzoylcholine et de la tributyrine par l'enzyme du plasma de cheval est due à une seule et même enzyme. Cette constatation lui a été suggérée par le fait que le rapport de l'hydrolyse de l'ACh et de celle des autres substrats ne change pas après la purification de l'enzyme.

Par contre, Lévy,³⁵ en étudiant différentes estérases du sérum, nous indique que dans le sérum de cobaye, il existe plusieurs estérases, notamment la tributyrinestérase, pseudo-ChE et une quantité non négligeable de ChE spécifique. Elle explique la présence de cette ChE spécifique par le fait que l'acétyl- β -méthylcholine n'est pas hydrolysée par une préparation purifiée à partir du sérum, tandis qu'elle est faiblement hydrolysée par le sérum non purifié.

Les résultats obtenus avec le sérum non purifié sont à peu près conformes aux résultats obtenus par Augustinsson.

En 1945, Nachmansohn et Rothenberg⁴⁷ ont étudié l'action des estérases des différents tissus nerveux sur quelques esters. Ils ont montré que les estérases du tissu nerveux et des érythrocytes ont des caractères communs bien définis, et qu'il y a une concentration optimale pour le substrat et une inhibition par excès de substrat.

Par ailleurs, ces enzymes hydrolysent la propionylcholine aussi vite ou moins que l'ACh, alors que la butyrylcholine est hydrolysée très lentement, sinon pas du tout.

Des estérases d'autres tissus, tels que le sérum, montrent des propriétés totalement différentes. Elles hydrolysent la propionylcholine plus rapidement que l'ACh et la butyrylcholine plus rapidement que la propionylcholine. Ces estérases ne sont pas inhibées par une forte concentration d'ACh, comme c'est le cas pour la ChE type-érythrocytes.

En 1946, Bodansky¹³ a observé que la triacétine est hydrolysée par une préparation d'érythrocytes humains. Il a aussi montré que ce substrat est hydrolysé par une préparation de cerveau de souris. Cette hydrolyse est fortement influencée par des anticholinestérases.

Les observations de Bodansky ont montré que la notion acceptée jusqu'alors — que l'enzyme du cerveau et des érythrocytes serait spécifique pour les esters de choline et incapable d'hydrolyser des esters ordinaires — était fausse et basée sur un nombre insuffisant de substrats (tributyrine et méthylbutyrate).

Poursuivant les observations de Bodansky, d'autres auteurs^{7, 12, 30, 69} ont employé la triacétine comme substrat pour l'enzyme de différents tissus, considérés comme ChE spécifique.

La question de spécificité a été reprise par Adams et Whittaker dans une série de travaux résumés par Whittaker.⁶⁸ Les auteurs ont apporté quelque lumière sur certains points de la question, ils comparent l'activité enzymatique des cholinestérases des érythrocytes avec celle du sérum sur une série d'esters dans lesquels ils ont changé systé-

matiquement le groupe acyle et le groupe alcoyle. Ils ont montré que l'estérase du sérum a une activité maxima avec les esters de butyrate, activité qui décroît quand on diminue ou augmente le nombre de C. Ces deux enzymes, indifféremment de leur origine, montrent davantage d'activité avec des esters de choline qu'avec des esters ordinaires. En employant des esters d'acétate, avec des alcools aliphatiques ordinaires et en variant le nombre de C dans la formule de l'alcool sans faire de ramifications dans les molécules, l'activité maxima est présentée par l'alcool butylique normal.

En modifiant ensuite la formule de l'alcool butylique normal par l'introduction de chaînes latérales, on constate que l'activité maximum a lieu pour les groupes méthyle additionnés sur le 3^e carbone, et l'activité augmente encore si l'on introduit deux groupes méthyle sur ce 3^e carbone.

Ces expériences ont été faites sur l'estérase des érythrocytes, ainsi que sur celle du sérum. Il y a donc une activité maxima dans les esters ordinaires, quand le groupe alcool est 3.3 diméthyl-buthyl, analogue carbonique de la choline.

Ceci montre encore que la « spécificité » envers la choline de l'enzyme type-érythrocytes est un terme incorrect, puisque l'enzyme type-sérum a aussi son activité maxima avec des esters de choline. La différence d'activité des deux enzymes envers les esters de choline provient du groupe acyle. L'enzyme type-érythrocytes a son activité maxima avec le groupe acétyle, alors que l'enzyme type-sérum a la sienne avec le groupe butyryle. Les auteurs proposent les termes « acéto-cholinestérase » et « butyro-cholinestérase » respectivement.

Augustinsson et Nachmansohn⁸ proposent le terme acétyl-cholinestérase pour l'enzyme qui jusque-là était appelé « spécifique », « vrai », « type-e ». Le terme d'acétyl-cholinestérase est plus approprié, car l'enzyme a une très grande affinité pour l'ACH. Sa constante de Michaelis est petite et le « turnover number » est élevé. Aucun autre ester n'est hydrolysé plus rapidement. Les auteurs n'ont pas proposé un terme pour l'autre estérase, celle du type-sérum, nommée « non-spécifique », « pseudo » ou « type-s ».

Augustinsson⁶ essaie aussi d'expliquer la question de spécificité de la manière suivante : il suppose que la spécificité dépend de la variation des protéines d'un tissu à l'autre. Le caractère protéinique de la molécule d'enzyme du sérum est probablement une albumine, alors que dans les érythrocytes, là où l'enzyme est attaché à la membrane, la protéine est probablement une lipoprotéine. C'est le cas pour le système nerveux central où l'enzyme est lié à la structure cellulaire.

Augustinsson considère donc les cholinestérases comme une « famille » d'enzymes avec des propriétés étendues.

La présence d'une estérase, capable d'hydrolyser des esters aromatiques à une vitesse plus grande que l'ACH a été démontrée⁵ dans le foie, les reins et les intestins du cobaye.

Dans ce chapitre, qui résume seulement une partie de la question de spécificité, nous constatons qu'il existe au moins deux enzymes

capables d'hydrolyser l'acétylcholine. Cette question est d'une importance capitale, car on admet que seule l'acétyl-cholinestérase est liée à la destruction de l'ACh, libérée durant le processus d'une transmission nerveuse.

Nachmansohn ⁴⁵ a déjà indiqué que l'existence d'un enzyme dans un tissu n'indique encore rien sur son rôle. Mais il a pu démontrer l'importance de l'acétyl-cholinestérase et en déduire son rôle physiologique, par le fait que cet enzyme est concentré dans les régions où s'effectue la transmission nerveuse, et parce que cette concentration est suffisante pour détruire la quantité d'ACh, libérée pendant la période réfractaire.

De plus, l'acétyl-cholinestérase est capable de scinder de très faibles concentrations d'ACh, comme c'est le cas dans la transmission nerveuse, alors que l'action de l'enzyme non-spécifique est nulle dans ce cas.

Mendel et Rudney ⁴² en concluent que la destruction de l'ACh est due surtout, sinon entièrement, à l'action de l'acétyl-cholinestérase.

Il résulte de ce qui précède que :

1. L'acétyl-cholinestérase semble être responsable de la destruction de l'ACh libérée *in vivo* en faibles quantités.
 2. L'action des différents facteurs doit être étudiée sur chaque enzyme séparément.
-

CHAPITRE III

Conditions expérimentales

1. ENZYMES.

Les différentes études concernant la spécificité de la ChE nous ont montré l'existence de plusieurs enzymes de caractères différents et de topographie multiple (cf. chapitre précédent).

Nous avons choisi comme source d'enzyme (ChE) le système nerveux (encéphale) et le sang (plasma et érythrocytes). Le choix de l'encéphale est légitimé par le fait que le point d'impact du Phb se situe surtout à son niveau.

Les contrôles que nous avons effectués sur le sang permettent d'une part de faire des études suivies, et d'autre part, de rapporter nos résultats à des recherches éventuelles sur l'homme. Ces contrôles ouvrent enfin la porte aux comparaisons avec les données obtenues par les autres auteurs qui, dans leur grande majorité, ont employé le sang comme principale source d'enzyme.

Pour des raisons de commodité et de sécurité, nous avons choisi comme animal d'expérience le cobaye.

(1). CHOLINESTÉRASES DU SANG.

A. *Types.* — L'activité cholinestérasique du plasma est représentée principalement par une ChE du type pseudo-cholinestérase à laquelle viennent s'adjoindre des quantités non négligeables d'acétylcholinestérase et de tributyrinestérase.³⁵

Dans les érythrocytes, l'enzyme est du type acétyl-cholinestérase. D'autres estérases, si elles sont présentes, s'y trouvent en quantité négligeable.

La mesure d'activité cholinestérasique des deux composants, plasma et érythrocytes, a été couplée avec des contrôles simultanés sur le sang total. Ceci nous a permis de déceler des erreurs techniques éventuelles (erreurs de dilution, centrifugation, pipetage, etc.). Des modifications dans l'activité du sang total doivent être suivies de variations parallèles de l'un ou des deux composants.

L'utilisation du sang total nous a permis d'effectuer ainsi un contrôle supplémentaire à côté de dosages à double échantillon.

B. Préparation de l'enzyme :

Sang : Le sang a été obtenu par une ponction cardiaque avec une seringue enduite d'Héparine (Liquémine Roche).

La quantité de sang prélevée à chaque ponction est de 3 cm³ environ. Le sang est transféré immédiatement dans une éprouvette contenant une goutte d'Héparine, à laquelle il est mélangé.

Plasma : Environ la moitié de la quantité de sang prélevée (1,5 cm³) est versée dans une éprouvette graduée à 0,1 cm³ (éprouvette à centrifugation).

Après une centrifugation de quinze minutes, la quantité totale est mesurée.*

Le plasma est aspiré et transvasé dans un tube à centrifugation identique au premier. Les érythrocytes restés dans le tube sont lavés deux fois avec une solution isotonique, puis centrifugés. L'eau de lavage est ensuite aspirée et ajoutée au plasma.

Une fois les lavages terminés, le volume de l'éprouvette contenant le plasma et l'eau de lavage est ramené au volume initial du sang à partir duquel le plasma a été préparé (1,5 cm³) par une solution Krebs-Ringer.

Erythrocytes : Comme la ChE des érythrocytes est attachée au stroma, on obtient les mêmes résultats avec ou sans hémolyse.⁵ Nous avons préféré travailler comme Aldrige,² avec des érythrocytes non hémolysés parce qu'ils donnent une solution plus homogène et maniable que celle obtenue avec des érythrocytes hémolysés.

Les érythrocytes de la préparation de plasma, déjà lavés deux fois avec la solution isotonique, sont dilués avec une solution isotonique jusqu'à obtention du volume initial du sang à partir duquel ils ont été préparés.

Nachmansohn et Fled (1947)⁴⁸ ont démontré qu'à la suite d'une centrifugation de suspension de tissu, on trouve 80 à 90 % de l'enzyme dans le précipité (l'enzyme est lié au stroma). Les auteurs ont souligné ce fait afin d'expliquer la diversité des résultats obtenus par d'autres expérimentateurs^{49, 55}, qui ne se sont servis que du liquide surnageant.

En conséquence, nous avons donc employé la suspension entière.

(2). CHOLINESTÉRASES DU CERVEAU.

A. Type et distribution : L'étude de la physiologie de l'épilepsie type grand mal, ainsi que le mode d'action des anticonvulsivants en général, et du Phb en particulier ayant mis en évidence le rôle prépondérant du diencéphale,⁵¹ nous avons examiné les modifications survenues d'une part au niveau du diencéphale seul, et d'autre part sur le reste du cerveau. L'enzyme à étudier est du type acétyl-cholinestérase, comme celui des érythrocytes.

* *Remarque* : La mesure est plus précise si elle est effectuée après la centrifugation. Avant cette opération, il est difficile de voir le ménisque à cause du sang qui adhère sur les parois du tube.

Des travaux antérieurs^{45, 49}, ont démontré que la quantité de ChE varie d'une espèce animale à l'autre, et, chez le même sujet, d'une partie du cerveau à l'autre, mais qu'elle reste par contre remarquablement constante dans la même espèce et dans la même partie du cerveau.

B. Préparation de la suspension de diencéphale et du reste du cerveau : Homogénéisateur Potter et Elvehjem : La préparation a été faite dans l'homogénéisateur décrit par Potter et Elvehjem.⁵⁰ Le tissu est déchiré alors qu'il se trouve dans une solution Krebs-Ringer, par un homogénéisateur en verre. Il consiste en un pilon actionné par un moteur et s'emboîtant dans une éprouvette. L'extrémité inférieure du pilon comporte plusieurs pointes servant à déchirer le tissu placé dans l'éprouvette. Durant l'homogénéisation, l'éprouvette est déplacée verticalement à plusieurs reprises, pendant que le pilon tourne rapidement. Le tissu est déchiré par les dents du pilon et les débris maintenus en dessous du pilon jusqu'à ce qu'ils soient assez minces pour passer entre le pilon et l'éprouvette.

La suspension ainsi formée se dépose très lentement et peut être aspirée à la pipette très facilement.

Nous avons employé une éprouvette graduée à 20 cm³, avec division à 0,1 cm³ pour pouvoir faire la pesée, l'homogénéisation et la dilution dans le même récipient.

Technique : L'animal décapité, son cerveau enlevé immédiatement est lavé avec une solution saline pour le débarrasser de toute trace de sang. On sépare ensuite le diencéphale du reste du cerveau.*

La pesée du diencéphale et celle du reste du cerveau sont effectuées directement dans deux éprouvettes d'homogénéisateur.

Les tissus sont additionnés d'une petite quantité (2 cm³ environ) de solution isotonique. La suspension et le broyage sont ensuite effectués dans l'homogénéisateur. Une fois l'opération terminée, on retire le pilon et on dilue la suspension avec une solution isotonique de manière à obtenir une suspension dans laquelle chaque cm³ correspond à 0,2 gr. de tissu frais.

2. SUBSTRATS.

Comme substrat, nous avons employé l'ACh, car elle représente le substrat physiologique (aucun autre substrat physiologique n'aurait été trouvé jusqu'à présent, sauf la propionylcholine, au niveau de la rate de bœuf).⁶⁸

Toutes les cholinestérases de l'organisme hydrolysent l'ACh d'une façon assez nette, quels que soient leur type et leur topographie.

Nous avons choisi l'iodure d'ACh (Hoffman-La Roche) qui est un sel plus stable que le chlorure et moins hygroscopique que le bromure et le chlorure.

* Nous tenons à remercier le Professeur Weber de nous avoir indiqué la manière d'effectuer la séparation du diencéphale du cerveau.

La concentration de substrat employée, de 0,011 M, constitue la concentration optimum pour la ChE des érythrocytes et du cerveau, et elle est suffisante pour l'étude de l'activité de la ChE sérique. Des contrôles effectués avec des concentrations variables nous ont donné des résultats justifiant le choix de cette concentration.

La benzoylcholine et l'acétyl- β métylcholine ont été employées dans nos travaux préliminaires de vérification qualitative des enzymes, mais nous les avons ultérieurement abandonnées car l'acétylcholine a suffi pour nous permettre de déceler des variations quantitatives.

3. SOLUTION-TAMPON (KREBS-RINGER).

Pour la préparation de solutions (substrats, enzyme), et pour le dosage, nous avons employé le mélange suivant (solution Krebs-Ringer bicarbonatée) : ⁶⁶

1) NaCl	0,9 %	(0,154 M)	100 parties
2) KCl	1,15 %	(0,154 M)	4 parties
3) CaCl ₂	1,22 %	(0,11 M)	3 parties
4) KH ₂ PO ₄	2,11 %	(0,154 M)	1 partie
5) MgSO ₄ .7H ₂ O ..	3,82 %	(0,154 M)	1 partie
6) NaHCO ₃	1,3 %	(0,154 M)	21 parties

Pour simplifier la préparation et le maniement des solutions, il a été jugé bon de faire les solutions (1) à (5) à une concentration 5 fois plus grande que celle désignée. Les solutions plus concentrées sont stables pendant des mois quand on les garde au frais. Pour la préparation de solution de Krebs, les solutions (1) à (5) sont faites dans les proportions indiquées ci-dessous et diluées ensuite à une concentration cinq fois inférieure, conservation au froid durant une semaine environ.

Pour faire la solution de bicarbonate, 16 cm³ de la solution (6) sont dilués à 100 cm³, avec la solution saline de Krebs. Chacune de ces six solutions est isotonique et par conséquent leur mélange, quelles qu'en soient les proportions, l'est aussi. On fait barboter un mélange de CO₂ 5 % plus N₂ 95 % dans la solution bicarbonatée, pendant une demi-heure au moins, avant chaque dosage. Ce barbotage chasse l'oxygène de la solution (réaction anaérobie) et forme avec le bicarbonate un système de *tampon*.

Le pH de ce mélange final, après barbotage, a été contrôlé à plusieurs reprises au cours du travail, par la méthode potentiométrique, et n'est pas sorti des limites 7,2 - 7,4.

4. PHENOBARBITAL.

L'étude *in vivo* a été effectuée après l'administration à l'animal par voie orale de doses uniques ou répétées de Phb (sel sodique). Les doses uniques, respectivement de 51 mg/kg et 150 mg/kg ont été administrées

trois heures avant le prélèvement de l'enzyme. Les contrôles d'animaux ayant reçu journellement 35 mg/kg ont été effectués le dixième, le vingtième et le trentième jours.

Ces doses représentant l'effet du Phb en expérimentation animale (cobaye) :

D'une part l'activité :

35 mg - dose antiépileptique maximum (DE 95)

51 mg - dose dormitive moyenne (DD 50),

D'autre part la léthalité :

150 mg - dose mortelle maximum (DL 95).

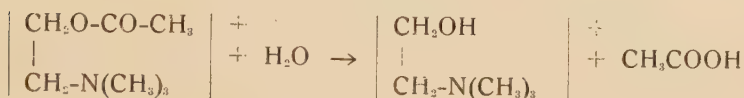
Le prélèvement de l'enzyme des animaux traitées par des doses répétées a été effectué à la même heure (huit heures du matin), alors que l'animal n'a pas encore reçu son alimentation.

CHAPITRE IV

Méthodes

1. METHODE DE MESURE DE L'ACTIVITE CHOLINESTERASIQUE

La ChE hydrolyse l'ACh en choline et acide acétique :



L'activité de la ChE peut être mesurée par des méthodes soit biologiques, soit chimiques.

(1). MÉTHODE BIOLOGIQUE.

Elle consiste en la mise en présence d'une préparation de ChE et d'une quantité connue d'ACh. Après un laps de temps déterminé, on évalue la quantité d'ACh hydrolysée en comparant l'effet biologique de la quantité initiale d'ACh à l'action de l'ACh non hydrolysée restante.

Le substrat biologique de la réaction est constitué par le pouvoir contractant d'un muscle isolé (iléon de cobaye, muscle dorsal de sangsue, rectus abdominis de grenouille, etc.), soit par l'effet hypotenseur (pression artérielle) d'un animal entier.

(2). MÉTHODES CHIMIQUES.

Elles sont basées sur le dosage de l'acide acétique libéré par l'hydrolyse enzymatique.

Nous distinguons plusieurs groupes de méthodes chimiques :

A. Méthodes manométriques : Différentes méthodes gazométriques ont été utilisées pour la mesure de l'activité cholinestérasique, notamment la méthode de Van Slyke,⁵⁶ celle de Barcroft⁶⁴ et celle de Warburg.⁴ C'est cette dernière, introduite par Ammon⁴ en 1933, dans la mesure de l'activité cholinestérasique, que nous avons adoptée avec quelques modifications.

Très délicate, exigeant une spécialisation, cette méthode offre l'avantage d'une grande exactitude, d'un travail en série et permet de suivre l'évolution de l'activité enzymatique au cours de la réaction. Le

substrat, sous l'effet de l'enzyme, est hydrolysé en alcool et acide correspondant, et ce dernier libère le CO_2 d'une solution tampon bicarbonatée.

La quantité de gaz dégagée est donnée par la variation de pression à volume constant.

Les résultats finals sont exprimés en volume de CO_2 à 0° et 760 mm. Hg, en tenant compte d'un facteur constant caractéristique de chaque manomètre.

Cette constante est déterminée par rapport à la température du bain, la densité du liquide manométrique, le volume de la fiole, etc.

C'est la méthode manométrique avec l'appareil de Warburg que nous avons utilisée (dans la plupart de nos recherches) pour le dosage de l'activité cholinestérasique *in vitro* et *in vivo* (animal normal et animal drogué).

Dans le chapitre III, nous avons déjà donné les conditions expérimentales concernant la préparation de l'enzyme, du substrat, du système tampon ainsi que les conditions d'étude du Phb.

Nous présentons ci-dessous la technique utilisée lors du déroulement de nos expériences. Elle est basée sur le principe de la méthode manométrique : mesure de la quantité de CO_2 dégagé, par les variations de pression, à volume et à température constants.

Nous avons utilisé un volume constant de liquide de 2,6 cm^3 :

2,2 cm^3 de tampon bicarbonaté saturé de CO_2 ,

0,2 cm^3 de AChI à 3,9 %, correspondant à 0,3 % dans le volume final = 0,011 M,

0,2 cm^3 de préparation enzymatique dans la tubulure latérale,

et un volume de gaz constant (le niveau du liquide Brodie dans la branche fermée a toujours été ramené à 150 mm^3).

La température constante du thermostat a été de 38° .

Le milieu anaérobie et le pH = 7,4 constant ont été obtenus par barbotage du mélange gazeux (5 % CO_2 + 95 % N_2 , dans la solution bicarbonatée pendant au moins 30 minutes et dans chaque manomètre (après la mise en place des différentes solutions) pendant trois minutes.

Ce dernier barbotage est effectué alors que les flacons sont déjà immergés dans le thermostat et a lieu pendant leur période de stabilisation thermique.

Le mélange enzyme-substrat est effectué trente-cinq minutes après l'immersion.

Les lectures sont effectuées toutes les dix minutes, la première lecture (dix minutes après le mélange) a été prise comme point de départ. La quantité de CO_2 dégagée pendant les trente minutes suivantes indique, après soustraction de la variation thermobarométrique et de l'hydrolyse spontanée, le degré d'activité de la ChE par rapport à 0,2 cm^3 de préparation enzymatique.

B. Méthodes titrimétriques :

Dans le cadre de ces méthodes, l'acide libéré est titré continuellement par une solution de NaOH de titre connu.

Le pH de la réaction, qui s'effectue à une température constante et en agitant continuellement le tube, est gardé à peu près constant par cette neutralisation.

L'activité enzymatique est indiquée par la quantité de NaOH utilisée pendant un laps de temps déterminé, quantité qui correspond à l'acide acétique libéré par l'enzyme (compte tenu de l'hydrolyse non enzymatique).

a) *Méthode des indicateurs* : La valeur du pH tenu constant par le NaOH peut être contrôlée par l'intermédiaire des indicateurs colorés (méthode des indicateurs). L'utilisation des liquides biologiques opaques ou colorés rend difficile la lecture par cette méthode et restreint ainsi son champ d'application.

b) *Méthode électrotitrimétrique* : Cet inconvénient est éliminé par l'emploi d'une méthode électrotitrimétrique qui substitue aux indicateurs l'emploi d'un pH-mètre.

Ces méthodes sont douées d'une plus grande exactitude et permettent le libre usage des divers liquides biologiques (sang, extrait de tissus, etc.).

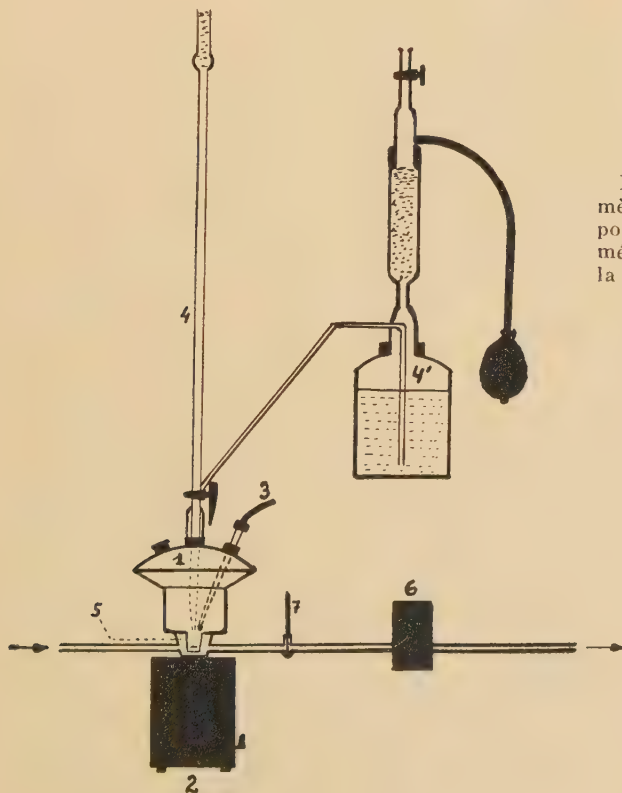


FIGURE 1 : Microtitrimètre Frommel-Radouco pour la mesure électrochimétrique de l'activité de la ChE.

La méthode électrométrique, basée sur l'utilisation d'un couple d'électrodes et d'un système d'agitation mécanique nécessite en général l'emploi de quantités relativement grandes de substrat. Pour éliminer ces inconvénients, Frommel, Radouco-Thomas et nous-même avons employé une micro-méthode basée sur l'utilisation d'une électrode combinée (unique) et d'un système d'agitation magnétique permettant de réduire au maximum le récipient de mesure.

L'appareillage comprend un récipient en deux parties (rodage planimétrique) pourvu d'un microrécipient de titrage (contenance 2 cm³) et de trois tubes rodés. Dans le premier tube s'adapte une microélectrode combinée (b) qui permet l'estimation de 0,01 unité pH (Potentiomètre Métrohm Type E 187). Dans le second est fixée une microburette (c) de 5 cm³ graduée au 1/100 qui est en relation avec un réservoir (c') de NaOH exempt de CO₂ (chaux sodée). Le troisième tube permet l'introduction des différents réactifs. L'agitateur magnétique (d) imprime une rotation à un bâtonnet métallique — encastré dans du verre — qui se trouve dans le microrécipient. Il détermine ainsi une agitation continue et réglable du liquide. Le microrécipient se trouve dans une chambre isothermique (e). La circulation d'eau, alimentée par le thermostat de l'appareil de Warburg (W) est assurée par une pompe électrique aspirante et refoulante à fort débit (f), la température de sortie (37°05) est vérifiée par un thermomètre (g).

Nous avons également essayé de résoudre un second problème de cette méthode, à savoir le maintien du mélange enzyme-substrat à un pH strictement constant.

La plupart des expérimentateurs ramènent le pH à la valeur choisie par un écoulement discontinu de soude. Ces techniques entraînent des oscillations du pH autour de cette valeur. Stedman et White⁶³ neutralisent toutes les cinq minutes l'acide acétique formé. La réaction s'effectue donc constamment en milieu acide par rapport au pH mentionné. Sanz,⁵⁷ Delaunois et Casier,¹⁷ au contraire, ajoutent toujours un léger excès de soude et chronomètrent le temps nécessaire pour le retour de l'indicateur au pH choisi. Leurs déterminations se font donc en milieu légèrement alcalin.

Par l'utilisation de l'ultramicroburette décrite par Radouco-Thomas C., Radouco-Thomas S. et Frommel E.,⁵² nous pouvons déterminer un écoulement excessivement faible, mais continu, de soude. La solution étant elle-même très diluée (0,005 N), l'apport contrôlable de soude est infinitésimal (1 μ l = 27 NaOH) et peut être amené à correspondre exactement à la quantité d'acide acétique provenant de l'hydrolyse enzymatique (20-80 μ l NaOH par minute) ou même de l'hydrolyse spontanée du substrat (2-3 μ l NaOH par minute). Avec un peu de pratique, on arrive à régler la vitesse d'écoulement de la soude de manière à maintenir complètement immobile l'aiguille de l'indicateur potentiométrique. Toute la mesure s'effectue donc à un pH rigoureusement constant.

A des intervalles de temps réguliers (chaque minute, chaque quinze ou trente secondes), on lit les μ l de NaOH utilisés. Le dosage, qui peut commencer dès la première minute qui suit le mélange enzyme-substrat,

peut être terminé en 2-5 minutes. Sur un graphique, ces points s'alignent pratiquement sur une ligne droite. Néanmoins, pour extrapoler les résultats, nous avons utilisé la méthode statistique des régressions. L'écart entre les résultats graphiques et algébriques est très faible.

Les mesures ont été effectuées avec 1-2 cm³ d'ester de choline (iodure d'acétylcholine 0,011 M) et 0,05-0,1 cm³ d'enzyme sous forme de plasma, érythrocytes (sang héparinisé 1%) et suspension de cerveau après potterisation.

Les mesures ont été effectuées à un pH de 7,7.

L'activité cholinestérasique est exprimée par la quantité de NaOH 0,005 N.

Les contrôles effectués sur des échantillons en double n'ont révélé que des variations inférieures à 6%. L'ensemble des résultats concorde avec ceux que nous avons obtenus par la méthode manométrique.

En résumé, l'appareillage et la technique adoptés permettent d'effectuer la mesure électrométrique de l'activité des cholinestérases avec de très petites quantités de substrat et à un pH rigoureusement constant. Cela permet des mesures très précises et très rapides de l'activité enzymatique.

C. Méthode électrométrique de Michel : ⁴³

La méthode électrotitrimétrique présente certains inconvénients : il faut effectuer une neutralisation graduelle durant le dosage. Si l'acide acétique libéré n'est pas neutralisé, il peut abaisser le pH jusqu'à inhiber complètement l'activité enzymatique. De plus, il est impossible d'effectuer plus d'un dosage simultanément.

Michel a proposé une méthode moins précise, mais plus simple : cette méthode consiste à mesurer l'abaissement du pH d'une solution de tampon barbitone-phosphate, — abaissement provoqué par l'acide libéré durant un laps de temps déterminé par l'activité enzymatique sur l'ACh.

Cette solution a son pouvoir de tampon maximum à pH 8. Rappelons que l'enzyme a environ le même pH d'activité maximum. Il s'ensuit qu'une baisse du pH provoque une baisse de l'activité enzymatique, mais les résultats obtenus sont fonction linéaire de la quantité de l'enzyme, du fait que l'abaissement du pH provoque simultanément un affaiblissement de la capacité de tampon.

L'avantage de cette méthode réside dans sa simplicité. Il suffit en effet de deux mesures avec le pH-mètre, l'une au début de l'expérience, l'autre après un temps fixe. Ceci permet de conduire des titrages en série, avec le même pH-mètre.

D) Méthode colorimétrique :

Hestrin a proposé ²⁹ une méthode de mesure de la cholinacétylase dans laquelle l'ACh synthétisée entre en combinaison avec des réactifs appropriés (hydroxylamine et chlorure ferrique), donnant un produit de réaction coloré. La couleur formée est ainsi fonction de la quantité

d'ACh produite. Cette méthode est adaptable à la mesure de la ChE par la comparaison de la quantité d'ACh, avant et après action de l'enzyme.

Rider et al.,⁵¹ reprenant et modifiant la méthode de Gomori, proposent un moyen de mesurer l'activité de la ChE sérique en utilisant comme substrat le benzoate de phényle. Le phénol libéré est titré colorimétriquement grâce à un réactif spécial.

(3). MÉTHODE HISTOCHIMIQUE.

Une méthode histochimique a été développée par Koelle et Friedenwald.³¹ Elle permet, par l'emploi de réactifs appropriés, de localiser l'enzyme ainsi que de distinguer entre les deux types d'enzymes.

2. METHODES DE MESURE DE L'ACTIVITE ANTICHOLINERGIQUE DU PHENOBARBITAL.

Nous nous sommes servis de la technique classique de Chang et Gaddum¹⁴ et d'un appareillage perfectionné utilisé pour l'étude des organes isolés à l'Institut de Thérapeutique de Genève. Comme organe d'expérimentation, nous avons choisi l'iléon de cobaye.

Celui-ci est suspendu dans un tube et attaché à un inscripteur classique qui marque les contractions sur le tambour.

Le liquide d'immersion est le Tyrode et le bain est maintenu à une température constante (34°). Les contractions sont marquées alors que le tambour est arrêté.

Tout d'abord, l'on marque la contraction due à l'acétylcholine (test). Après lavage, décontraction et retour à la normale du muscle, on met une solution de la substance à étudier (Phb) en contact avec le muscle pendant cinq minutes, ensuite, sans lavage, l'on ajoute une solution d'acétylcholine ; la contraction ainsi obtenue est comparée à celle du test.

Après lavage, l'expérience est répétée avec d'autres concentrations de substance.

3. METHODES DE MESURE DE L'ACTIVITE, DE LA TOXICITE ET DU METABOLISME DU MEDICAMENT ETUDIE, LE PHENOBARBITAL.

(1). MESURE DE L'ACTIVITÉ ET DE LA TOXICITÉ.

En thérapeutique, le Phb est utilisé suivant la dose administrée, soit comme antiépileptique, soit comme dormitif. Afin d'étudier son action *in vivo* sur la ChE chez le cobaye, nous avons été obligés de déterminer tout d'abord la posologie de ce médicament en expérimentation. En effet, nous voulions d'une part connaître avec exactitude les zones d'activité et de toxicité de ce médicament en vue de son administration en doses uniques et en doses chroniques, et cela avec une marge de sécurité suffisante.

D'autre part, il fallait déterminer les doses à administrer pour obtenir un effet certain (antiépileptique, dormitif ou mortel) auquel pourraient être rattachées ultérieurement les modifications éventuelles de la ChE.

Nous rappelons brièvement la méthode utilisée dans ce double but :

a) *Technique* : A divers lots de 5 à 10 cobayes, nous avons administré *per os* des doses croissantes de Phb. Pour chaque dose administrée, nous avons noté dans le lot de cobayes correspondant le nombre de cobayes totalement protégés contre la crise épileptique électrique, et, pour les doses supérieures, le pourcentage de cobayes somnolents et le pourcentage d'animaux tués.

L'ensemble de ces résultats pourrait être groupé en trois séries représentant les variations en fonction des doses croissantes de Phb, du pourcentage d'animaux protégés, endormis ou morts.

De telles données, représentées graphiquement, se présentent sous forme d'une courbe sigmoïde. L'équation qui la définit est d'un manie- ment difficile, mais la méthode développée par Finney²² permet de trans- former cette courbe en une droite en utilisant l'échelle logarithmique pour les doses (loi de Weber-Fechner) et en modifiant l'axe des pour- centages au moyen des probits.*

Cette méthode — appliquée dans l'étude des anticonvulsivants par S. Radouco-Thomas^{52b} est préférable à d'autres citées par divers auteurs^{11, 44} car il nous a semblé qu'elle permettait d'atteindre le maxi- mum de précision (détermination des limites de confiance) avec le mi- nimum d'animaux.

L'étude des effets du Phb a pu ainsi être ramenée à trois droites :

- l'une délimitant l'intervalle d'activité antiépileptique ;
- la seconde délimitant l'intervalle de toxicité (effet dormitif) ;
- la troisième celui de la léthalité.

Les équations caractérisant chacune de ces droites ont permis de calculer les doses limites, c'est-à-dire celles n'ayant aucun effet (pro- tection, sommeil, mort) sur les animaux, et celles déterminant la pro- tection, le sommeil ou la mort des animaux.

Ces doses n'ont pas été calculées algébriquement par rapport à l'effet sur 0 % et 100 % des animaux. Les valeurs correspondant à ces ordonnées extrêmes sont plutôt théoriques et ne peuvent être définies avec exactitude que sur un très grand nombre d'animaux.

Pratiquement, elles peuvent être remplacées par les doses déter- minant un effet sur 5 et 95 % des animaux.

Nous avons donc désigné par dose minima celle qui agissait sur 5 % des animaux et par dose maxima celle qui agissait sur 95% des animaux.

Nous leur avons ajouté la dose moyenne qui correspond à un effet sur 50 % des animaux, car sa position dans la partie médiane de la droite lui confère un maximum d'exactitude.

* Nous remercions Madame Dr. S. Radouco-Thomas pour l'aide précieuse qu'elle nous a fournie dans les calculs de probits.

Comme la relation cause/effet a pu (par la méthode probits) être exprimée linéairement, même si ces valeurs n'ont pas été déterminées expérimentalement, elles peuvent être extrapolées à partir des équations de régression. Cette relation tire son exactitude de la précision avec laquelle la méthode probits nous a permis de calculer, à partir des points expérimentaux, la position et la pente de chaque droite.

De plus, des calculs appropriés permettent de déterminer exactement les domaines de variations de chacune d'elles.

Ces valeurs sont donc correctes et reproductibles.

Nous avons désigné les différentes doses par D_5 , D_{50} , D_{95} , en spécifiant pour chacune l'effet étudié :

DE = dose effective (effet antiépileptique),

DD = dose dormitive (sommeil),

DL = dose léthale.

La connaissance des doses effectives et toxiques minima, moyenne et maxima nous permet de chiffrer la marge de sécurité du Phb.

Pour l'estimation de cette marge de sécurité, la pharmacologue tient à sa disposition plusieurs index.

Index 50 : Certains auteurs⁶⁵ ont utilisé l'index 50 :

$$\text{Index 50} \cong I_{50} = DT_{50}/DE_{50}.$$

Ce choix est basé sur la plus grande facilité de détermination expérimentale de la dose 50 et surtout sur son faible intervalle de variation (les valeurs extrêmes d'une régression sont en général soumises à de plus grandes variations que la valeur médiane).

Index thérapeutique : Il exprime le rapport entre la dose minima toxique et la dose maxima curative :

$$\text{Index thérapeutique} = It = DT_{95}/DE_{05}.$$

Comme nous l'avons déjà dit, les doses 5 et 95, bien qu'extrapolées, sont correctes et reproductibles. Elles peuvent donc servir de base pour l'établissement des index, mais étant donné que leurs limites de variations sont plus larges que celles de la dose 50, l'index thérapeutique présente une moindre précision que l'index 50.

L'un et l'autre index ont pour valeur limite « 1 ». Ils sont favorables pour les valeurs supérieures à 1, c'est-à-dire tant que le numérateur (la dose toxique ou léthale) est supérieur au dénominateur (la dose active).

La détermination des doses actives, antiépileptiques, dormitives (D_5 , D_{50} , D_{95}), ainsi que l'appréciation de la marge de sécurité concrétisée par les index cités ci-dessus, nous ont permis d'effectuer une administration rationnelle du médicament étudié (Phb), et cela à des doses effectives correspondant à la thérapeutique humaine.

(2) MESURE DU MÉTABOLISME DU PHÉNOBARBITAL.

En plus du choix des doses actives et toxiques du Phb, un second problème s'est posé, celui de l'horaire des prélèvements. Pour étudier l'action du Phb sur la ChE du cobaye, en fonction des doses à une heure donnée, nous avons été obligé de déterminer l'heure optima, à savoir le moment où l'action de notre médicament atteindrait son effet maximal.

Les données de la littérature concernant le métabolisme du Phb sont jusqu'à présent incomplètes et contradictoires.^{9, 32}

Aux méthodes chimiques, nous avons préféré une méthode biologique basée sur l'étude de l'effet anticonvulsivant. Nous avons le choix entre deux moyens :

1) Contrôle du métabolisme basé sur l'effet anticonvulsivant en fonction des heures pour une dose choisie : les résultats obtenus par cette méthode sont grossiers et difficilement comparables, aussi nous a-t-il paru préférable d'utiliser la seconde méthode.

2) Contrôle du métabolisme en fonction de l'horaire pour un effet donné : nous établissons par la méthode probit l'action du médicament aux différentes heures par les doses protégeant 50 % des animaux (DE_{50} contre l'épilepsie expérimentale électrique).

CHAPITRE V

Résultats expérimentaux

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats expérimentaux concernant :

- I) Le métabolisme, l'activité et la toxicité du Phb en expérimentation (cobaye) ;
- II) Les valeurs physiologiques chez le cobaye de la ChE du plasma, des érythrocytes et du cerveau (diencéphale et reste du cerveau);
- III) L'action du Phb sur les différentes cholinestérases cités ci-dessus ;
- IV) L'action du Phb sur l'effet cholinergique de l'ACh (iléon du cobaye).

I. RESULTATS CONCERNANT LE METABOLISME, L'ACTIVITE ET LA TOXICITE DU Phb EN EXPERIMENTATION.

1. *Métabolisme* : Les expériences (20) effectuées sur 29 animaux ont été étalées sur huit heures.

Afin de suivre dans le temps l'action du Phb, nous avons choisi comme test de référence le phénomène fondamental de l'épilepsie électrique : l'état de coma (chute de l'animal).

Les variations des doses nécessaires pour déterminer un même effet (protection 50 % contre l'état de coma) aux différentes heures (1, 3, 4, 5 heures) permettent de suivre les variations d'effet du médicament dans le temps.

La figure 2 montre qu'à partir de la 3^e heure, l'action du Phb atteint le plateau (action maxima). Les calculs statistiques ne décèlent pas de différences significatives entre les différentes heures du plateau (3 h., 5h., 8h.).

En nous basant sur ces données, nous avons choisi la troisième heure comme temps de prélèvement, car cela nous a permis de faire le jour même la laborieuse préparation des différentes cholinestérases étudiées (plasma, érythrocytes, diencéphale et reste du cerveau).

2. *L'activité et la toxicité du Phb* : Les résultats que nous présentons sont basés sur 15 expériences (32 animaux).

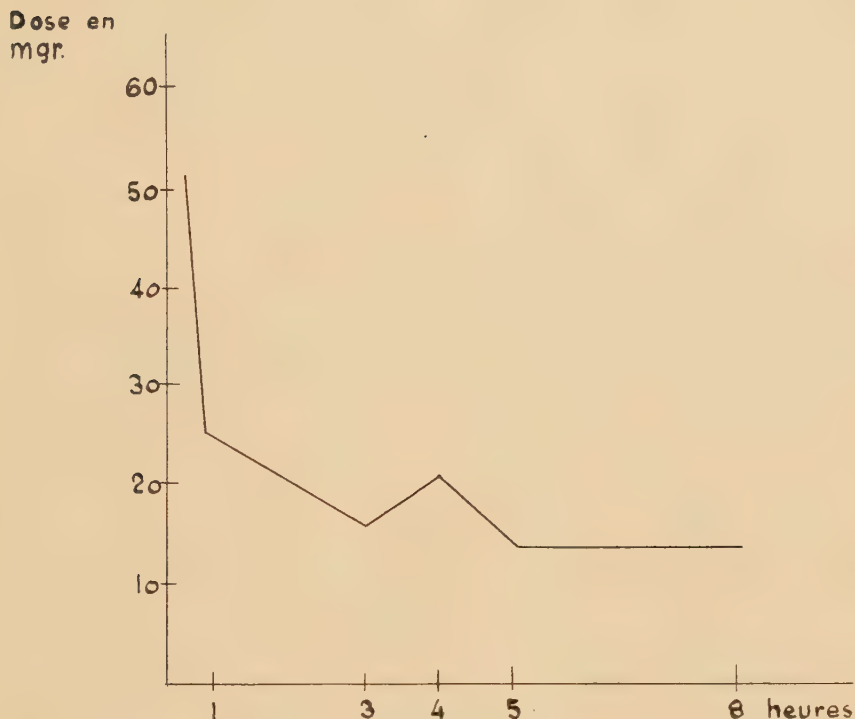


FIGURE 2. — Etude du métabolisme du Phb.

Par la méthode probits (cf. Méthodes), nous avons pu déterminer à partir des points expérimentaux les droites de régression délimitant les intervalles d'effet antiépileptique, d'effet dormitif et d'effet léthal.

A) Pour la détermination de l'intervalle d'activité du Phb, nous avons choisi comme test de référence (comme pour l'étude du métabolisme) l'état de coma (chute de l'animal) de l'épilepsie expérimentale.

Le choc électrique a été déclenché trois heures après l'administration de Phb (début d'action maxima du Phb). Nous avons noté en fonction des doses le pourcentage d'animaux de chaque lot, protégés contre la chute par le Phb.

L'ensemble des points expérimentaux nous a permis de construire la droite de régression à partir de laquelle nous avons calculé les doses effectives de l'intervalle d'activité antiépileptique.

$DE_{5\%}$	= 5 % d'animaux protégés contre la chute	14 mg/kg,
$DE_{50\%}$	= 50 % d'animaux protégés contre la chute	23 mg/kg,
$DE_{95\%}$	= 95 % d'animaux protégés contre la chute	37 mg/kg.

B) Pour la détermination de l'intervalle d'effet dormitif, nous avons noté le pourcentage d'animaux en état d'hypnose ou de narcose¹⁸

de chaque lot. L'effet dormitif a été étudié trois heures après l'administration du médicament (moment d'activité maxima du Phb).

Nous avons administré à quatre lots de cobayes des doses de 40, 50, 60, et 80 mg/kg. La droite de régression déduite des résultats obtenus a permis de calculer les doses dormitives suivantes :

$$DD_{\frac{1}{2}} = 35 \text{ mg/kg,}$$

$$DD_{60} = 51 \text{ mg/kg,}$$

$$DD_{95} = 77 \text{ mg/kg.}$$

C) Pour l'étude de la mortalité, nous avons utilisé la même méthode. Des doses de 70 à 150 mg/kg ont été administrées à des lots de 5 animaux et nous avons retenu pour chaque lot le pourcentage d'animaux qui succombaient dans les premiers jours suivant l'ingestion du médicament.

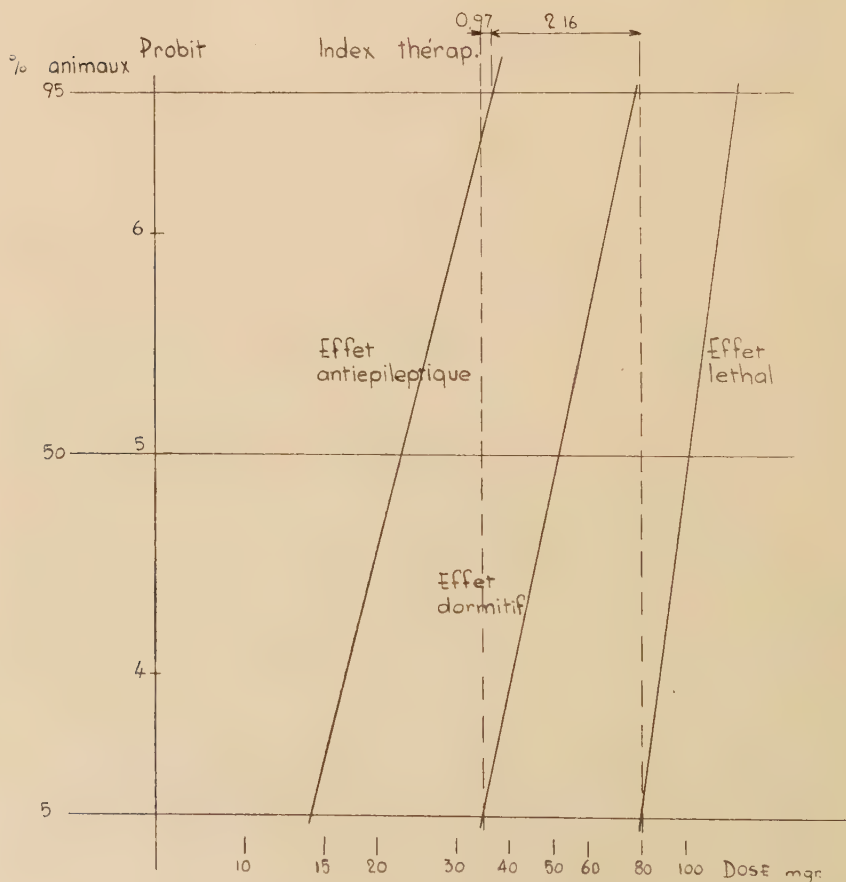


FIGURE 3. — Etude de l'activité et de la toxicité du Phb.

Les doses léthales déduites de ces expériences sont les suivantes :

$$DL_{50} = 80 \text{ mg/kg,}$$

$$DL_{50} = 101 \text{ mg/kg,}$$

$$DL_{95} = 150 \text{ mg/kg.}$$

Dans la figure 3, nous avons réuni les trois droites se rapportant à :

- 1) L'effet antiépileptique ;
- 2) L'effet dormitif ;
- 3) L'effet léthal.

La détermination des doses effectives (antiépileptiques, dormitives, léthales) minima, moyennes et maxima nous permet de chiffrer la marge de sécurité du Phb sous forme d'index thérapeutique et d'estimer ainsi d'une façon précise les doses uniques et chroniques à administrer aux cobayes pour l'étude de l'effet *in vivo* du Phb sur la ChE.

L'index thérapeutique par rapport à l'effet dormitif a pour valeur :

$$\frac{DD_5}{DE_{95}} = \frac{35}{37} = 0,97$$

Il est donc insuffisant (plus petit que 1).

L'index thérapeutique par rapport à l'effet léthal est de

$$\frac{DL_5}{DE_{95}} = \frac{80}{37} = 2,16$$

ce qui correspond à une bonne marge de sécurité.

II. RESULTATS CONCERNANT LES VALEURS PHYSIOLOGIQUES CHEZ LE COBAYE DE LA ChE DU PLASMA, DES ERYTHROCYTES ET DU CERVEAU (DIENCEPHALE ET RESTE DU CERVEAU).

Nous ferons précéder ces résultats d'une série de mesures préliminaires se rapportant à la méthodologie et aux conditions expérimentales (choix des constantes physico-chimiques et biologiques).

1. MESURES PRÉLIMINAIRES.

A) Contrôle de l'appareillage et des erreurs de technique.

Plusieurs facteurs peuvent influencer les résultats et faire apparaître des variations d'un manomètre à l'autre. Ces facteurs sont notamment : l'inégalité de la température du bain, les différences éventuelles des quantités d'ingrédients (substrat, solution bicarbonatée et surtout enzyme) et les erreurs possibles dans les déterminations du coefficient manométrique.

Pour contrôler la constance de tous ces facteurs et pour vérifier l'égalité des résultats de tous les manomètres, nous avons effectué l'expérience suivante :

Quatorze déterminations ont été faites, au cours desquelles nous avons placé dans chaque manomètre des quantités constantes de substrat, de solution bicarbonatée et d'enzyme. Nous avons multiplié chaque résultat par le coefficient manométrique correspondant et nous avons comparé entre eux les résultats obtenus.

La déviation moyenne était de 1,3 % et n'a pas dépassé 3 %. Cette précision nous a semblé suffisante pour nos travaux.

B) *Action de l'anticoagulant employé (Héparine) sur l'activité enzymatique.*

Nous avons effectué trois déterminations pour le plasma et trois pour le sérum, tous deux provenant du même sang. Nous avons obtenu les mêmes résultats à 2 % près, avec le plasma et le sérum indifféremment. Ceci nous prouve que l'Héparine est sans effet sur l'activité enzymatique et confirme ainsi les résultats obtenus par Augustinsson.⁵

C) *Stabilité de l'enzyme.*

Les dosages ont été effectués, dans la mesure du possible, immédiatement après la préparation de l'enzyme. Cependant, dans certains cas, l'enzyme a été, soit laissé à la température de la chambre (21°C.), soit déposé au frigidaire pour des laps de temps variables. C'est la raison qui nous a poussé à vérifier la stabilité de l'enzyme.

A cette fin, nous avons contrôlé l'activité enzymatique après des séjours de la préparation de vingt-quatre heures, quarante-huit heures, sept jours et vingt-et-un jours au frigidaire, ou de cinq heures à la température de la chambre.

Dans toutes les conditions mentionnées ci-dessus, nous avons constaté que l'activité de l'enzyme reste sensiblement constante. (Nous considérons comme constants des résultats ne dépassant pas 3% de variation).

D) *Choix de la quantité d'enzyme et de la concentration du substrat.*

(a). *Enzyme* : Nous avons effectué une série de dosages avec des quantités différentes de préparation d'enzyme (0,05 cm³, 0,1 cm³, 0,2 cm³, 0,3 cm³, 0,4 cm³). Ceci a été fait dans un double but :

1° De chercher quelle est la quantité d'enzyme permettant d'obtenir un grand déplacement du liquide manométrique, sans toutefois dépasser ses limites ;

2° De vérifier si le rapport entre la quantité d'enzyme et l'activité enzymatique est directement proportionnel.

Nous avons constaté que la quantité d'enzyme de 0,2 cm³ est celle qui convient le mieux pour nos dosages, quelle que soit la préparation

d'enzyme considérée. Nous avons également constaté que le rapport entre la quantité d'enzyme et l'activité enzymatique est directement proportionnel, à condition de ne pas employer une trop grande quantité d'enzyme (0,4). Dans ce cas, le dégagement est proportionnellement diminué.

(b) *Concentration du substrat* : Marnay et Nachmansohn³⁹ ont trouvé en 1937 que la concentration optima de l'ACh, pour la détermination manométrique, se rapproche de 0,01 M.

Lors des contrôles répétés depuis 1937, avec une variété de tissus nerveux, cette concentration de substrat a toujours été trouvée proche de l'optimum. Avec une concentration moindre de substrat, la vitesse d'hydrolyse diminue rapidement. A une concentration plus élevée, l'effet est le même.

Nous avons effectué une vérification sommaire dans cette direction, en employant cinq concentrations différentes de substrat (0,005 M, 0,0075 M, 0,01 M, 0,0125 M, 0,02 M).

Les résultats ont prouvé que, parmi toutes les concentrations essayées par nous, celle de 0,01 M est la concentration donnant l'activité la plus grande.

Comme nous avons employé l'iodure d'acétylcholine comme substrat, la concentration choisie pour nos dosages a été de 3 mg/cm³, ce qui correspond à 0,0011 M.

D'autre part, nous avons fait une série d'expériences avec la benzoylcholine à une concentration de 0,006 et avec l'acétyl- β -méthylcholine à une concentration de 0,03 M. Ces expériences ont été faites avec les cholinestérases du sang total, du plasma et des érythrocytes. Ces expériences ont confirmé que l'hydrolyse de la benzoylcholine est due uniquement au composant plasmatique du sang.

En ce qui concerne l'acétyl- β -méthylcholine, l'hydrolyse est due aux deux composants dans les proportions d'environ 10 % pour le plasma et 90 % pour les érythrocytes.

Ainsi que nous l'avons déjà dit, nous avons poursuivi nos travaux uniquement avec l'ACh qui nous a suffi pour permettre de déceler des variations quantitatives de l'activité cholinestérasique.

2. L'ACTIVITÉ CHOLINESTÉRASIQUE CHEZ L'ANIMAL NORMAL.

A) *Méthode manométrique d'Ammon.*

Ces recherches ont eu pour but de contrôler les variations de l'activité cholinestérasique en dehors de toute action médicamenteuse. Dans les essais préliminaires, nous avons déjà envisagé les modifications dues aux erreurs techniques, nous nous attacherons ici uniquement aux variations dues au facteur biologique, à savoir les variations de la ChE chez les différents animaux (variations interindividuelles) et chez le même animal (variations individuelles).

Nous présentons successivement sous forme de tableaux synopti-

ques les données concernant l'activité des cholinestérases du sang de cobaye (plasma, érythrocytes et sang total) et du tissu nerveux (diencéphale et reste du cerveau).

a) *Les cholinestérases du sang.*

TABLEAU I.

ANIMAL		RESULTATS *		
N ^{os}	Poids gr.	Plasma	Erythrocytes	Sang total
1	720	94	104	170
2	820	72	107	172
3	680	62	155	185
4	670	65	63	128
			64	119
5	890	85	110	182
		83	129	196
6	620	88	75	163
		95	77	157
7	620	75	81	147
		66	88	152
8	670	83	91	172
		78	87	175
9	730	52	109	168
10	740	79	126	199
11	580	110	126	178

* Les résultats de ce tableau et des tableaux suivants sont exprimés en μ l de CO₂ dégagés pendant trente minutes par 0,2 cc de préparation d'enzyme (voir préparation d'enzyme).

Chaque chiffre représente la moyenne de deux ou trois résultats.

Seuls les résultats concordants ont été relevés.

Variations entre les animaux : Comme certaines recherches sur le sang ont été couplées à des déterminations de l'activité de la CHE du cerveau (nécessitant la sacrifice de l'animal) il était important de connaître les limites de variations d'un animal à l'autre pour pouvoir apprécier l'action médicamenteuse.

Ces variations, comme d'autres auteurs ³⁷ l'ont également remarqué, sont relativement grandes.

Comme il ressort du tableau I, les résultats obtenus chez les divers animaux s'échelonnent :

pour le plasma, entre 52 et 110, en moyenne 79 ;
pour les érythrocytes, 63 et 155, en moyenne 93 ;
pour le sang total, entre 119 et 199, en moyenne 166.

Variations chez un même animal : Pour contrôler la constance de l'enzyme chez un même animal, des ponctions cardiaques ont été répétées à dix jours environ d'intervalle. Le tableau II montre les résultats de ce travail.

TABLEAU II.

Intervalles entre les dosages D 1 et D 2 en jours	PLASMA		ERYTHROCYTES		SANG TOTAL	
	D 1	D 2	D 1	D 2	D 1	D 2
8	88	95	75	77	163	157
9	83	78	91	86	172	174
10	85	83	109	128	182	196
14	74	65	80	87	147	151

D 1 = 1^{er} dosage,

D 2 = 2^e dosage.

Les déterminations étant effectuées dans la même saison, nous avons pu éviter les variations saisonnières.

b) *La cholinestérase du système nerveux central.*

Dans le tableau III, nous présentons les résultats obtenus chez les divers animaux étudiés, dans le système nerveux central.

Tableau III.

ANIMAL		DIENCEPHALE		RESTE DU CERVEAU	
N ^{os}	Poids gr.	Pds. gr.	Résultats	Pds. gr.	Résultats
1 ..	720	0,850	152	2,970	173
2 ..	820	0,875	166	3,130	166
3 ..	680	0,755	183	4,000	139

La comparaison de l'activité cholinestérasique chez les divers animaux étudiés montre, tant pour les échantillons provenant de la diencéphale que pour ceux provenant du reste du cerveau, des variations inférieures aux variations d'un animal à l'autre des cholinestérases du sang, mais seulement de peu supérieures à leurs variations individuelles. La précision est donc plus ou moins du même ordre de grandeur, si l'on compare les données, individuelles pour le sang, et interindividuelles pour le système nerveux central.

III) RESULTATS CONCERNANT L'ACTION DU Phb SUR LA ChE
DU PLASMA DES ERYTHROCYTES ET DU CERVEAU
(DIENCEPHALE ET RESTE DU CERVEAU).

Les résultats sont basés sur des déterminations effectuées sur des cobayes adultes, mâles, et faites à la même époque des variations physiologiques.

1. L'ACTION DU Phb *in vivo*.

Nous présentons les résultats concernant l'administration de doses uniques de 51 et 150 mg/kg et de doses chroniques de 35/mg-kg de Phb.

A) *Doses uniques* : Nous avons administré au cobaye des doses de 51 mg/kg (DD₅₀) et de 150 mg/kg (DL₅₀). Les ponctions cardiaques effectuées environ trois heures après l'administration du médicament ont donné les résultats suivants :

Les cholinestérases du sang :

Dans le tableau IV, nous présentons une étude comparative des activités cholinestérasiques chez les différents animaux, avant et après l'absorption de 150 mg/kg de Phb.

TABLEAU IV.

ANIMAL		SANG TOTAL		PLASMA		ERYTHROCYTES	
N ^{os}	Poids	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après
1 ..	730	168	164	52	55	109	113
2 ..	740	199	193	79	71	126	120
3 ..	580	178	181	—	—	—	—

Chez le même animal, le dosage de la ChE a été suivi après une semaine de repos par un dosage de la ChE, trois heures après l'administration du Phb.

Nous avons constaté que les variations entre ces deux dosages ne dépassent pas les variations des dosages effectués chez l'animal normal à un intervalle égal. Ceci s'applique au dosage de l'enzyme du plasma, des érythrocytes et du sang total.

Les résultats obtenus avec la dose de 51 mg/kg sont identiques à ceux obtenus avec la dose de 150 mg/kg (tableau V).

TABLEAU V.

SANG TOTAL		PLASMA		ERYTHROCYTES	
Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après
152	152	66	66	88	90

La cholinestérase du cerveau : Nous n'avons sacrifié pour l'étude de la ChE du cerveau que les animaux ayant reçu 150 mg/kg.

TABLEAU VI.

ANIMAL		DIENCEPHALE			RESTE DU CERVEAU		
N ^{os}	Poids	Poids	Phb	Etalon	Poids	Phb	Etalon
1 ..	620	0,845	153	152-182	2,855	184	139-180
2 ..	650	0,835	140		3,225	172	
3 ..	540	0,990	170		2,745	151	
4 ..	570	0,815	147		3,075	162	

La comparaison des résultats obtenus avec les valeurs de l'étalon ne montre pas une action manifeste du Phb, surtout étant donné la forte dose administrée. Certaines valeurs obtenues avec le diencéphale sont légèrement inférieures aux variations minima normales. Mais cette variation est trop faible pour permettre d'en tirer des conclusions précises, d'autant plus que les valeurs normales sont basées sur un petit nombre d'animaux.

Quant au reste du cerveau, aucune des valeurs enregistrées ne sort des limites de variation, chez l'animal non drogué.

B) Doses chroniques :

L'étude de l'action des variations des cholinestérases sous l'effet de fortes doses uniques de Phb a été effectuée parallèlement à l'étude des variations sous l'effet des doses chroniques.

Les cobayes, groupés par lots de trois, ont reçu pendant dix, vingt et trente jours des doses quotidiennes de 35 mg/kg de Phb (dose dormitive minima).

Pour présenter des réponses parallèles sur les cholinestérases du sang et du cerveau, nous avons sacrifié les animaux. Par conséquent, les comparaisons seront basées sur des variations interindividuelles et non individuelles.

La ChE du sang :

Les résultats concernant la ChE du sang sont résumés dans le tableau VII :

TABLEAU VII.

JOURS	ANIMAL	PLASMA	ERYTHROCYTES	SANG TOTAL
Val. norm.		52-110	63-155	119-199
10	1	56	94	136
	2	123	97	192
	3	53	94	135
20	4	81	75	144
	5	110	91	177
	6	95	70	146
30	7	74	82	146
	8	90	72	159
	9	79	78	157

* Valeurs normales (limites de variations).

Les chiffres obtenus pour la ChE du plasma ne sortent guère des limites des variations physiologiques ; que ce soit après dix, vingt ou

trente jours de traitement, les doses chroniques de 35 mg/kg ne paraissent pas avoir une influence significative.

Pour les érythrocytes, les valeurs observées se trouvent dans l'échelle normale. Il en est de même pour le sang total.

Deux animaux du dernier lot n'ont pas été sacrifiés après trente jour. Les dosages ont été faits dix et vingt-quatre jours après cessation du traitement (Cf. tableau VIII).

Les chiffres ci-dessous montrent que les variations enregistrées ne dépassent pas les variations individuelles chez l'animal normal.

TABLEAU VIII.

JOURS	PLASMA		ERYTHROCYTES		SANG TOTAL	
	A	B	A	B	A	B
30 j. d'adm. de dos. chron. ...	74	79	82	78	146	157
12 j. après cess. du traitement .	75	84	81	91	147	172
24 j. après cess. du traitement .	66	78	88	87	152	174

Remarque : Les lettres A et B désignent respectivement les deux cobayes qui n'ont pas été sacrifiés après l'administration de doses chroniques.

Cholinestérase du cerveau :

Nous présentons également un tableau synoptique des résultats se rapportant à l'action chronique (35 mg/kg) du Phb sur la ChE du cerveau (tableau IX).

TABLEAU IX.

Période du traitement en jours	ANIMAL	DIENCEPHALE		RESTE DU CERVEAU	
		Poids	Act. enzym.	Poids	Act. enzym.
10	1 ..	0,745	160	2,915	154
	2 ..	0,835	165	2,760	180
	3 ..	0,750	157	3,020	171
20	4 ..	0,730	129	2,920	166
	5 ..	0,790	151	3,100	174
	6 ..	0,755	143	3,235	175
30	7 ..	0,710	166	2,910	184

Alors que les valeurs obtenues sur le reste du cerveau demeurent dans les limites des variations interindividuelles, celles du diencéphale sont, en général, parmi les valeurs physiologiques inférieures. Quelques-unes sont même en-dessous de la normale, mais pas assez pour être concluantes.

2. L'ACTION DU PHÉNOBARBITAL IN VITRO.

Comme source d'enzyme, nous avons utilisé le plasma, les érythrocytes et l'homogénat du cerveau de cobaye, préparés comme il a été indiqué au chapitre III.

Les méthodes utilisées ont été successivement la méthode manométrique d'Ammon et la méthode électrotitrimétrique Frommel-Radouco.

A. Méthode manométrique :

Nous avons mis en présence de sang (plasma, érythrocytes) et d'homogénat de cerveau d'animaux normaux les quantités suivantes de Phb sodique : 10 mg., 5 mg., 1 mg., 0,5 mg., sous un volume de 0,1 cm³.

La solution inhibitrice a été versée dans l'appendice sur la solution enzymatique.

Les lectures effectuées toutes les cinq minutes dans les différents manomètres nous ont permis de faire les constatations suivantes : au début de la réaction, on remarque une diminution du dégagement de CO₂, ou même une absorption de CO₂, proportionnellement à la quantité de Phb sodique. Ce phénomène serait dû à l'alcalinité du Phb sodique (pH 8,4) et nullement à l'action inhibitrice du Phb puisque peu à peu (maximum dix minutes pour 10 mg Phb), le pH du mélange revient à son niveau initial (par suite de l'hydrolyse de l'ACh).

A partir de ce moment (dix minutes environ), les dégagements de CO₂ sont identiques pour les solutions enzymatiques pures et pour les solutions mises en présence de 0,5, 1,5 et 10 mg de Phb sodique.

Les valeurs obtenues sont les suivantes :

TABLEAU X

Phb	PLASMA		ERYTHROCYTES		CERVEAU	
	Normal	Drogué	Normal	Drogué	Normal	Drogué
0,5 mg	—	—	110	109	—	—
1 mg	72	71	115	114	135	136
5 mg	59	58	124	124	—	—
10 mg	63	64	110	109	148	147

B) Méthode électrotitrimétrique :

Les mesures ont été effectuées à un pH de 7,7. En présence de Phb, nous avons attendu que, par suite du dégagement d'acide acétique, la solution soit revenue au pH de 7,7.

Nous présentons ci-dessous sous forme de graphique les résultats obtenus avec l'enzyme de cerveau, plasma et érythrocytes avec et sans Phb.

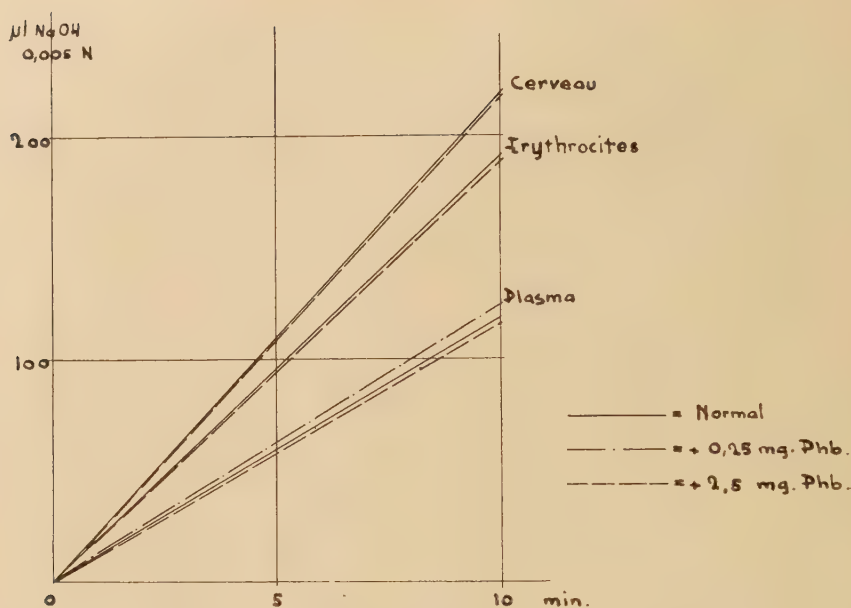


FIGURE 4. — Action du Phb sur les cholinestérases du cobaye *in vitro*.
Mesure par la méthode électrotitrimétrique.

Nous avons également effectué un dosage à un pH de 8,4 avec le plasma d'un autre animal et en présence de 10 mg de Phb. Les résultats restent remarquablement constants (16,6 pour le plasma seul, et 16 pour le plasma additionné de 10 mg de Phb).

IV. RESULTATS CONCERNANT L'ACTION DU Phb SUR L'EFFET CHOLINERGIQUE DE L'ACH (ILEON DU COBAYE).

Nous complétons les résultats de l'action du Phb sur le ChE *in vitro* et *in vivo* par l'examen de l'effet du même médicament sur le second membre du système, l'ACH.

Les résultats obtenus sur l'iléon de cobaye par la méthode de Chang et Gaddum¹⁴ peuvent être résumés par le graphique suivant :

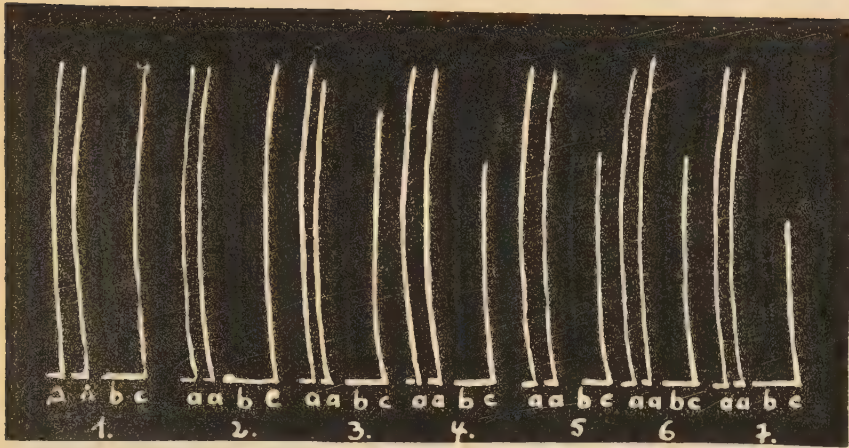


FIGURE 5.

Effet anticholinergique des doses croissantes de Phb (25 γ /cc à 250 γ /cc) :

A = Contraction du muscle iléal du cobaye sous l'influence de 0,002 γ /cc de chlorhydrate d'ACh. (test).

a = Test à l'ACh après lavage.

b = Mise en contact durant cinq minutes avec une solution de Phb (non sodique),

Phénobarbital γ /cc.

1 b	25
2 b	50
3 b	75
4 b	100
5 b	150
6 b	200
7 b	250

Acétylcholine % inhibition.

1 c	0
2 c	0
3 c	14
4 c	30
5 c	30
6 c	30
7 c	50

c = Test à l'ACh sans lavage.

Ces résultats confirment ceux trouvés par D. Vincet.⁶⁷ Ils montrent que le Phb présente une action inhibitrice envers l'effet cholinergique de l'ACh. Cette inhibition est partielle : elle débute à 75 γ /cm³ et atteint son maximum à 250 γ /cm³.

Elle est réversible, car des lavages successifs permettent le retour de la contraction acétylcholinique au niveau initial du test.

Discussion et Conclusion

Le but de notre travail a été de mettre en évidence les relations entre le Phb et le système ACh-ChE.

Comme les résultats le montrent, notre travail s'est échelonné sur plusieurs étapes.

I. Dans une étape préliminaire, nous avons étudié l'effet des doses croissantes de Phb chez le cobaye. Les résultats obtenus nous ont permis de distinguer trois intervalles de doses correspondant aux *effets antiépileptique, dormitif et toxique de ce produit*. Ces données nous ont guidé dans le choix des doses à administrer aux animaux pour l'étude de l'effet du Phb sur les ChE *in vivo*.

1) *Administration des doses à pouvoir antiépileptique* (35 mg/kg per os) : Cette dose correspond, comme l'indique la figure III, à un effet antiépileptique total chez tous les animaux (DE_{35}) et à un effet dormitif chez 5 % d'entre eux ($DD_5 = 35$ mg/kg). Nous avons éliminé les rares animaux en état d'hypnose et nous avons fait les prélèvements sur les autres.

Leur taux de ChE correspond donc à un effet antiépileptique maximal du Phb.

Comme la marge de sécurité vis-à-vis de l'effet léthal est grande ($Tt = 2.16$), nous avons pu administrer cette dose quotidiennement. Ceci nous a permis d'étudier l'effet de l'administration prolongée du Phb sur la ChE du cobaye.

2) *Administration des doses à action dormitive* (51 mg/kg). Nous n'avons pas administré de dose correspondant à l'effet hypnotique moyen (DD_{50}) entraînant le sommeil de tous les cobayes ($DD_{95} = 8$), car l'index thérapeutique nous a montré que la marge de sécurité est inexistante et qu'une telle dose entraînerait la mort de 5 % des animaux drogués.

3) *Administration des doses mortelles* : Pour vérifier une éventuelle action massive sur les cholinestérases, nous avons choisi la dose maximale pharmacologique, c'est-à-dire la dose léthale 95 %.

II. Une autre étape, très laborieuse mais que nous pouvons également considérer comme préliminaire, a consisté à suivre l'étude des

variables pharmacologiques du médicament étudié, pour la détermination des valeurs physiologiques du taux de la ChE dans le sang et le cerveau du cobaye.

Les dosages effectués sur les animaux nous ont mis en présence d'une série de valeurs (tableau I) occupant toute l'échelle de 52 à 105 μ l pour le plasma et de 63 à 155 μ l pour les érythrocytes.

L'écart entre les valeurs extrêmes est donc assez grand.

Par contre, les activités cholinestérasiques du plasma et des érythrocytes d'un même sujet présentent une assez grande stabilité. Les ponctions effectuées après dix jours sur un même animal ont donné des résultats très rapprochés. Les variations observées d'un dosage à l'autre ne dépassent guère le taux enregistré pour les erreurs expérimentales.

Le taux de la ChE du plasma et des érythrocytes peut donc être considéré comme constant chez un même animal.

Les dosages répétés, au cours d'une administration prolongée de Phb à un même animal, prennent donc pleinement leur sens — toute variation supérieure aux variations insignifiantes précitées serait à rattacher à l'effet du Phb.

Quant à la ChE du cerveau, les résultats obtenus nous ont montré des variations interindividuelles relativement faibles. Ce fait est important, car, en pratique, dans ce domaine, nous ne pouvons faire que des comparaisons entre animaux.

En résumé, l'effet du Phb *in vivo* pourra être étudié avec une précision suffisante et égale si l'on effectue des comparaisons avec et sans Phb, pour le plasma et les érythrocytes, sur un même animal, et pour le diencéphale et le reste du cerveau entre les animaux.

Après avoir déterminé les éléments fondamentaux concernant la pharmacologie du Phb chez le cobaye et les taux de ChE du sang et du système nerveux central, nous avons enfin abordé le rapport entre le Phb et le système ChE/ACh.

1) Nous nous sommes attaché tout d'abord à la relation Phb/ChE. Les résultats *in vivo* montrent que le Phb administré en doses uniques (DD_{50} et DL_{05}) n'entraîne pas d'inhibition dans la ChE du sang (plasma, érythrocytes), ni dans la ChE du cerveau (diencéphale et reste du cerveau).

Ces résultats concordent avec deux obtenus par Adriani et Ronvenstein¹ qui n'ont constaté aucun effet par la méthode manométrique de l'Evipal sur la ChE du sérum.

Schutz⁶⁰ aussi, étudiant l'effet des barbituriques sur l'enzyme de sérum par la méthode Hall-Lucas, a trouvé que les barbituriques en doses uniques n'exercent aucun effet sur la ChE du sérum.

Frommel, Bischler, Gold, Favre et Vallette,²³ au cours de travaux effectués à l'Institut de Thérapeutique de Genève, ont montré que les barbituriques provoquent une action inhibitrice de force moyenne de la ChE du sérum. Toutefois, ce sont des barbituriques commerciaux qui ont été utilisés. Le Somnifène Roche, utilisé dans une série d'expériences, contient une faible quantité d'anesthésique local, du diéthyl-amine et le solvant, en plus du barbiturique proprement dit.

En effet, Favre, Frommel et Vallette²⁴ ont déjà pu constater dans une autre étude que l'acide diallylbarbiturique (Dial CIBA) dans un solvant inconnu, exerce une action inhibitrice sur l'activité cholinestérasique du sérum plus grande que celle de l'acide diallylbarbiturique dissout dans de l'éthylurétane, et que l'éthylurétane donne seul une inhibition se rapprochant de celle causée par l'éthylurétane additionné de barbiturique.

Il est probable que le seul responsable de l'inhibition est l'éthylurétane (l'urétane étant le noyau des inhibiteurs de la ChE par excellence — physostigmine et prostigmine).

Les cobayes soumis à un traitement chronique de Phb n'ont pas présenté d'inhibition significative du taux des cholinestérases étudiées.

Les données concernant les cholinestérases du sang (plasma et érythrocytes) sont rapportées aux valeurs physiologiques (variations individuelles) tandis que celles du diencéphale et du reste du cerveau sont rapportables aux moyennes physiologiques (variations interindividuelles).

Ces résultats, basés sur des cobayes traités pendant des temps variables, et basés sur trois contrôles (dix, vingt et trente jours) n'ont pas mis en évidence une action inhibitrice du Phb sur les cholinestérases du sang, ni sur celle de l'encéphale.

Les travaux de Schutz⁵⁶ qui a étudié l'action des barbituriques en administration répétée ne montrent pas de baisse significative de l'activité de la ChE du cerveau.

L'administration du Phb a été effectuée per os ou par injection, et les dosages ont été effectués après cinq, huit, onze et plus de quinze jours.

Le même auteur a trouvé des résultats opposés pour les extraits de muscle de la moëlle épinière et du sérum, où l'administration prolongée des barbituriques a provoqué une baisse considérable de l'activité cholinestérasique. Ces mêmes enzymes n'ont pas été affectés par l'administration d'une dose unique massive de barbiturique.

On voit donc d'une part que, dans leur ensemble, les résultats ne sont pas absolus, et d'autre part, qu'il existe un certain contraste entre la forte inhibition obtenue avec la moëlle épinière et l'absence d'inhibition obtenue avec le cerveau.

2) Devant l'absence d'inhibition *in vivo*, une série d'expériences s'est imposée, à savoir l'étude *in vitro* de la relation Phb/ChE.

Les travaux de Bernheim et Bernheim¹⁰ ont montré que les barbituriques (Phb 0,001 M) ne présentent *in vitro* aucun effet inhibiteur sur la ChE du cerveau. Adriani et Rovenstein¹ constatent également l'absence d'inhibition de l'Evipan sur la ChE du sérum.

Nous citerons enfin les travaux de Schutz⁵⁹ qui utilise comme barbiturique le Phb et le méthylphénylbarbital. Il a effectué par la méthode Hall-Lucas une série de dosages sur la ChE du sérum humain. Les concentrations de Phb utilisées s'étalent de 0,02 à 0,16 M. Comme le Phb détermine une forte alcalinité de la solution enzymatique, les sé-

runs contrôlés sont amenés avec de la NaOH au même pH. L'auteur conclut de ces dosages que, dans aucun cas, il n'a trouvé de différence significative entre les contrôles et les tests.

Nous avons repris ce problème en essayant de faire une étude plus complète.

Nous n'avons pas seulement dosé la ChE du plasma, mais nous avons fait des dosages comparatifs de ChE du cerveau, des érythrocytes et du plasma. Les diverses solutions enzymatiques ont été mises en présence de quantités variables de Phb : 0,1, 0,5, 1,5 et 10 mg, dans un volume constant de 2,6 cm³. L'effet du Phb a été suivi tout d'abord par la méthode manométrique. Mais l'alcalinité du Phb sodique modifiait, surtout pour les fortes doses, le pH du milieu tampon.

Nous avons donc complété cette étude par la méthode électrotitrimétrique. Les dosages ont été effectués à un pH de 7,7.

Une autre série de mesures a été effectuée à un pH de 8,4, sur le sérum, avec et sans Phb. Chaque résultat représente une moyenne de trois mesures.

Comme on l'a vu dans le chapitre des résultats nous n'avons enregistré dans aucun cas une diminution de l'activité cholinestérasique significative par rapport aux contrôles.

Les différences entre les tests et les contrôles sont minimes par la méthode électrotitrimétrique. Elles sont un peu plus fortes par la méthode manométrique, mais étant donné que ces variations ne sont nullement proportionnelles aux quantités de Phb utilisées, et toujours minimes par rapport au contrôle correspondant, elles restent sans signification.

Il faut donc conclure que le Phb n'exerce pas d'action inhibitrice *in vitro* sur les cholinestérases du plasma, des érythrocytes et du cerveau.

L'absence d'action inhibitrice du Phb sur les différentes cholinestérases nous a conduit à examiner les relations de ce produit avec le second facteur du système, à savoir l'ACH.

La méthode des organes isolés, avec l'iléon de cobaye comme organe effecteur cholinergique, nous a apporté une série de données qui jettent une lumière sur les relations entre le Phb, antiépileptique majeur, et l'ACH, substance physiologique ayant un rôle fondamental dans la transmission de l'influx nerveux.

La formation de l'ACH et sa destruction sont assurées par une série d'éléments à action catalytique qui assurent ainsi le rythme activité/repos aux différents niveaux.

L'administration *in vivo* (voie parentérale) ou *in vitro* (bain Tyrode) de l'ACH apporte au niveau des terminaisons post-ganglionnaires du système cholinergique entérique (iléon de cobaye) le même excitant que délivre l'influx nerveux lorsqu'il y parvient.^{15, 16, 19, 20, 25, 33}

Les résultats que nous avons illustrés par la figure V montrent que le Phb a une action inhibitrice progressive, qui est incomplète et réversible.

Nos résultats confirment ceux de Vincent D.⁶⁷ qui trouve aussi une inhibition partielle de l'ACh par le Phb.

Les travaux de Fernando H.,²¹ faits sur le cœur isolé de *Venus Mercenaria* mettent également en évidence l'action antiacétylcholinique des barbituriques.

Ainsi le diéthylbarbiturate de soude à une concentration de 10^{-3} M. inhibe-t-il de 50 % l'action dépressante de l'ACh.

Le Phb sodique, presque sans effet à une concentration de 10^{-4} M, contrecarre l'action muscarinienne de l'ACh sur le cœur. Cette inhibition, sans jamais être totale, atteint la valeur élevée de 75 %.

Les différentes données sur les organes isolés (iléon, cœur) mettent en évidence une nette action antiacétylcholinique du Phb.

L'ensemble de ces résultats montre que le Phb n'inhibe pas l'activité des cholinestérases du cobaye, mais qu'il a un effet inhibiteur certain sur le médiateur principal de l'influx nerveux — l'ACh.

Bibliographie

1. Adriani J. & Rovenstein E. A. (1941). *Anesth. & Analg.* **20**, 109.
2. Aldrige W. N. (1950). *Biochem. J.* **46**, 151.
3. Alles G. A. & Hawes R. C. (1940). *J. Biol. Chem.* **133**, 375.
4. Ammon R. (1934). *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **233**, 486.
5. Augustinsson K. B. (1948). *Acta Physiol. Scand.* **15**, Supply 52.
6. Augustinsson K. B. (1948). *Nature*, **162**, 194.
7. Augustinsson K. B. (1949). *Arch. Biochem.* **23**, 111.
8. Augustinsson K. B. & Nachmansohn D. (1949). *Science*, **110**, 98.
9. Barany E. H. & Stein Jensen E. (1946). *Arch. int. Pharmacodyn.* **73**, 1.
10. Bernheim F. & Bernheim M. L. C. (1936). *J. Pharmacol.* **57**, 427.
11. Bertrand Y. (1949). *J. Physiol.* **41**, 499.
12. Blaschko H. & Holton P. (1949). *Brit. J. Pharmacol.* **4**, 181.
13. Bodansky O. (1946). *Ann. N. Y. Acad. Sc.* **47**, 521.
14. Chang H. C. & Gaddum J. H. (1933). *J. Physiol.* **79**, 255.
15. Chang H. C., Cziu F., Hsu C.-H. & Lim R.-K. (1937). *Chin. J. Of Physiol.* **12**, 1.
16. Dale HH.-H. (1933). *J. of Physiol.* **80**, 16.
17. Delaunois A. L. & Casier H. (1948). *Arch. int. Pharmacodyn.* **75**, 371.
18. Demole Y. (1927). *Arch. f. exp. Path. and Pharm. B.* **120**, 229.
19. Feldberg W. (1943). *J. of Physiol.* **4**, 432.
20. Feng T.-P. *Chin. J. Physiol.*, (1937). **12**, 331. (1939). **14**, 209. (1940). **15**, 367.
21. Fernando H. E. (1952). *Science*, **115** ; 2976. 43.
22. Finney M. A. (1947). *Probit Analysis. A statistical treatment of the sigmoid reponse curve.* Cambridge. University Press.
23. Frommel E., Bischler A., Gold P., Favre M., Vallette F. (1947). *Helv. physiol. pharmacol. Acta.* **5**, 64.
24. Frommel E., Favre M. & Vallette F. (1948). *Helv. Med. Acta* **15**, Fasc. 3, 314.
25. Gaddum G.-H., Khajal M.-A. & Rydin H. (1937). *J. Physiol.* **89**, 9.
26. Genuit H. & Labenz K. (1941). *Arch. exp. Path. Pharmacol.*, **198**, 369.
27. Heim F. & Fahr A. (1940). *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **195**, 59.
28. Heim F. & Rhode W. (1943). *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **202**, 215.
29. Hestrin S. (1949). *J. Biol. Chem.* **180**, 249.
30. Holton P. (1948). *Biochem. J.* **43**, xiii.
31. Koelle G. B. & Friedenwald J. S. (1949). *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **70**, 617.
32. Koselka F. L., Hine C. H. et Greiber M. F. (1942). *Feder. Proc.* **1**, 156.
33. Lapique L. (1939). *Arch. Int. pharmacodyn.* **91**, 437.
34. Levy J. (1951). *J. Physiologie* **43**, 223.
35. Levy J. (1951). *J. Physiologie* **43**, 229.
36. Levy J. (1951). *J. Physiologie* **43**, 235.
37. Lippi M. (1950). *Minerva Medica Torino* **41-42**, 301.
38. Loewi O. (1921). *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **189**, 239.
39. Marnay A. & Nachmansohn D. (1937). *Bull. Soc. Chim. Biol.* **19**, 446.
40. Mazur A. & Bodansky O. (1946). *J. Biol. Chem.* **163**, 261.
41. Mendel B. & Mundell D. R. (1943). *Biochem. J.* **37**, 64.
42. Mendel B. & Rudney H. (1943). *Biochem. J.* **37**, 59.
43. Michel H. O. (1949). *J. Lab. Clin. Med.* **34**, 1564.

44. Miller L. C. & Tainter M. L. (1944). *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **261**, 57.
 45. Nachmansohn D. (1939). *Bull. Soc. Chim. Biol.* **21**, 761.
 46. Nachmansohn D. (1950). Nerve impulse, Josiah Mcy Jr. Foundation.
 47. Nachmansohn D. & Rothenberg M. A. (1945). *J. Biol. Chem.* **158**, 653.
 48. Nachmansohn D. & Fled E. A. (1947). *J. Biol. Chem.* **171**, 715.
 49. Okinaka S., Yoshikawa M. & Goto J. (1951). *Tohoko Journal of experimental medicine.* **55** : **1**, 81.
 50. Potter V. R. & Elvehjem C. A. (1936). *L. Biol. Chem.* **114**, 495.
 51. Radouco C., Frommel Ed., Gold Ph., Greder G., Melkonian D., Radouco S., Strassberber L., Vallette F. & Ducommun M. (1952). *Arch. int. Pharmacodyn.* **92**, 129.
 52. Radouco-Thomas C., Radouco-Thomas S. & Frommel Ed. (1953). *Arch. Sci.* **6**, 163.
 - 52 b. Radouco-Thomas S. (1952). Contribution à la pharmacodynamie et au mécanisme d'action des anti-convulsivants. La Diphénylhydantoïne, Thèse 3, Genève.
 53. Richter D. & Croft P. G. (1942). *Biochem. J.* **36**, 746.
 54. Rider J. A., Moeller H. C. & Dubois K. P. (1951). *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **76** : **3**, 427.
 55. Riker W. F. & Wescoe W. C. (1946). *J. Pharmacol. & Experim. Therap.* **88**, 58.
 56. Rinkel M. & Pijoan M. (1938). *J. Pharmacol.* **64**, 228.
 57. Sanz M. (1944). *Helv. Physiol. Acta* **2**, C 29.
 58. Schutz F. (1941). *Nature* **148**, 725.
 59. Schutz F. (1943). *J. Physiol.* **102**, 269.
 60. Schutz F. (1943). *J. Physiol.* **102**, 259.
 61. Schutz F. (1944). *Quart. J. Exp. Physiol.* **33**, 35.
 62. Stedman E., Stedman E. & Easson L. H. (1932). *Biochem. J.* **26**, 2056.
 63. Stedman E., Stedman E. & White A. C. (1933). *Bioch. J.* **27**, 1056.
 64. Stedman E. & Stedman E. (1935). *Biochem. J.* **29**, 2107.
 65. Swinyard E. A. & Goodman L. S. (1946). *Feder. Proc.* **5**, 205.
 66. Umbreit WW., Burris R. H. & Stauffer J. F. (1949). *Manometric Techniques and Tissue Metabolism.* Burgess Publishing Co.
 67. Vincent D. (dans Gold Ph., Frommel Ed., Radouco C., Greder G., Melkonian D. M., Della Santa R., Radouco S., Vallette F. & Ducommun M.) (1952). *Arch. int. pharmacodyn.* **91**, 440.
 68. Whittaker V. P. (1951) *Physiol. Rev.* **31**, 312.
 69. Zeller E. A. (1948). *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **6** : C 36-C 37.
 70. Zeller E. A. & Bissegger A. (1943). *Helv. Chim. Acta* **26**, 1619.
-

